

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**MECANISMOS DE RESISTENCIA A PENICILINA EN CEPAS CLÍNICAS DE
*Streptococcus pneumoniae***

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autor:

Mirtha Elizabeth Diaz Melgar

Asesora:

Dra. Theresa Ochoa Woodell

Co-Asesor:

MSc (c) Erik Mercado Zarate

Lima-Perú

2022

MECANISMOS DE RESISTENCIA A PENICILINA EN CEPAS CLÍNICAS DE *Streptococcus pneumoniae*

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

ÍNDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	1%
2	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
5	worldwidescience.org Fuente de Internet	1%
6	dokumen.site Fuente de Internet	1%
7	sisbib.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	idoc.pub Fuente de Internet	<1%
9	repositorioslatinoamericanos.uchile.cl Fuente de Internet	

ÍNDICE

N° Pág.

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. Introducción.....	3
I.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
I.1.1 Clasificación taxonómica:	3
I.1.2 Características	4
I.1.3 Infecciones	4
I.1.4 Epidemiología de enfermedades neumocócicas.....	4
I.2 Penicilina.....	5
I.2.1 Importancia	5
I.2.2 Desarrollo de la resistencia a penicilina.....	6
I.2.3 Determinación de la resistencia antimicrobiana.....	6
I.2.4 Mecanismos moleculares de resistencia a penicilina G	8
I.3 Serotipos y resistencia antibiótica.....	11
II. Justificación del estudio	11
III. Pregunta de investigación	12
IV. Objetivos.....	12
IV.1 Objetivo general.....	12
IV.2 Objetivos específicos	13
V. Materiales y métodos.....	13
V.1 Población y muestra	13
V.1.1 Población para el primer estudio	13
V.1.2 Población para el segundo estudio.....	15
VI.2 Extracción de DNA de cepas de <i>S. pneumoniae</i>	16

V.3 Estandarización de sistemas de PCR convencional	16
V.3.1 Elección de cebadores	16
V.3.3 Amplificación del ADN.....	17
V.3.4 Electroforesis en gel de agarosa	17
V.4 Análisis estadístico.....	18
VI. Resultados	18
VI.1 Estandarización de PCR multiplex	18
VI.2 Alteraciones de los genes <i>pbps</i> y <i>murM</i> en cepas invasivas y colonizadoras	19
VI.3 Correlación de la susceptibilidad antimicrobial y resultado de PCR.	21
VI.4 Asociación entre la presencia de alteraciones y la resistencia a penicilina G ...	24
VII. Discusión	25
VIII. Conclusiones.....	31
IX. Recomendaciones.....	31
X. Referencias bibliográficas.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de penicilina G.....	5
Figura 2. Porcentaje de resistencia a penicilina de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en los últimos años en Lima.....	6
Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de acción de penicilina.....	9
Figura 4. Mutaciones en mosaico de genes <i>pbp2x</i> de aislados clínicos.....	10
Figura 5. Amplificación de genes de resistencia mediante electroforesis en gel de agarosa.....	19
Figura 6. MIC de penicilina G según los genotipos identificados por PCR convencional en cepas invasivas de <i>S. pneumoniae</i>	22
Figura 7. MIC de penicilina G según los genotipos identificados por PCR convencional en cepas colonizadoras de <i>S. pneumoniae</i>	23
Figura 8. Valores de MIC (µg/ml) según el número de alteraciones en <i>pbps</i> y <i>MurM</i> alterados.....	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de corte para penicilina.....	7
Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación de los genes de resistencia y <i>lytA</i>	16
Tabla 3. Frecuencia de genes <i>pbp2x</i> , <i>pbp2b</i> , <i>pbp1a</i> y <i>murM</i> alterados.....	20
Tabla 4. Número de genes <i>pbp2x</i> , <i>pbp2b</i> , <i>pbp1a</i> y <i>murM</i> alterados.....	20
Tabla 5. Genotipos alterados en cepas invasivas y colonizadoras.	21
Tabla 6. Mediana de MIC de penicilina G según este alterados o no alterado el gen.....	21
Tabla 7. Asociación entre el número de genes alterados y la resistencia según los puntos de corte para cepas meníngeas y no meníngeas.....	24

RESUMEN

Introducción: *Streptococcus pneumoniae* es el responsable de la mayoría de casos de neumonía, bacteremia y meningitis a nivel mundial. La penicilina ha sido el principal antibiótico para el tratamiento de enfermedades neumocócicas por mucho tiempo; sin embargo, las cepas resistentes han ido aumentando en los últimos años en el Perú. La resistencia ha sido atribuida a mutaciones en los genes *pbps2x*, *2b*, *1a* y *murM*.

Objetivo: Determinar los mecanismos de resistencia a penicilina en cepas de *S. pneumoniae* aislados de niños con enfermedad neumocócica invasiva y niños portadores sanos de Lima a través del estudio de los genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM*.

Métodos: Se analizaron 60 cepas aisladas de niños menores de 14 años con enfermedad neumocócica invasiva y 136 cepas de muestras nasofaríngeas provenientes de niños portadores menores de dos años en Lima entre 2016 y 2019. Todas las cepas eran no-sensibles a penicilina por el disco de oxacilina. La susceptibilidad antimicrobial a penicilina G fue determinada por la concentración mínima inhibitoria. Se determinó la presencia de genes *pbps* y *murM* alterados mediante dos sistemas de reacción en cadena de la polimerasa convencional estandarizados en este estudio.

Resultados: La presencia del gen *pbp2x* alterado fue hallada en 96.7% (58/60), *pbp2b* en 70.0% (42/60), *pbp1a* en 85.0% (51/60) y *murM* en 5.0% (3/60) cepas invasivas. En cepas portadoras por otra parte, *pbp2x* estuvo alterado en 93,4% (127/136), *pbp2b* en 88.2% (120/136), *pbp1a* en 59.6% (81/136) y *murM* en 13.2% (18/136). El genotipo alterado más frecuente fue *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x*. Hubo una correlación positiva entre el número de genes alterados y los valores de MIC en cepas invasivas y colonizadoras respectivamente. Asimismo hubo asociación entre el número de genes alterados y la resistencia cuando se emplea puntos de corte para cepas meníngeas.

Conclusiones: Hubo asociación entre la presencia de genes alterados y la resistencia a penicilina cuando se emplea puntos de corte para cepas meníngeas. Además, las cepas con un mayor número de genes alterados presentaron mayor valor de MIC.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, penicilina G, *Streptococcus pneumoniae*, *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a*, *murM*.

ABSTRACT

Background: *Streptococcus pneumoniae* is responsible for the majority of cases of pneumonia, bacteremia and meningitis worldwide. Penicillin has been the main antibiotic for treating pneumococcal diseases for a long time; however, resistant strains have been increasing in recent years in Peru. Penicillin resistance in clinical strains has been attributed to mutations in the *pbps2x*, *2b*, *1a* genes and *murM*.

Objective: Determine the mechanisms of resistance to penicillin in strains of *S. pneumoniae* isolated from children with invasive pneumococcal infection and healthy carrier children from Lima by studying the *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* and *murM* genes.

Methods: We analyzed 60 isolates from children under 14 years with invasive pneumococcal disease (IPD) and 136 strains of nasopharyngeal carriers younger than 2 years in Lima between 2016 and 2019. All the strains were not sensitive to penicillin due to the oxacillin disk. Antimicrobial susceptibility to penicillin was determined by Minimum Inhibitory Concentrations (MIC). Detection of *pbps* and *murM* mutations was determined using two multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) systems standardized in this study.

Results: The presence of the altered *pbp2x* gene was found in 96.7% (58/60), *pbp2b* in 70.0% (42/60), *pbp1a* in 85.0% (51/60) and *murM* in 5.0% (3/60) invasive strains. In carrier strains, on the other hand, *pbp2x* was altered in 93.4% (127/136), *pbp2b* in 88.2% (120/136), *pbp1a* in 59.6% (81/136) and *murM* in 13.2% (18/136). The most frequent altered genotype was *pbp1a*, *pbp2b* and *pbp2x*. There was a positive correlation between the number of altered genes and the MIC values in invasive and colonizing strains respectively. There was also an association between the number of genes mutated and altered for resistance when cut-off points for meningeal strains were used.

Conclusions: There was an association between the presence of altered genes and resistance to penicillin when cut-off points for meningeal strains are used. In addition, the strains with a greater number of altered genes presented a higher MIC value.

Keywords: antimicrobial resistance, penicillin G, *Streptococcus pneumoniae*, *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a*, *murM*.

I. Introducción

Streptococcus pneumoniae es el responsable de la mayoría de casos de neumonía y meningitis a nivel mundial en niños (1). Las penicilinas son las drogas de elección para el tratamiento de enfermedades neumocócicas (2); sin embargo, las cepas resistentes han ido aumentando en los últimos años en el Perú y en el resto del mundo (3).

Las penicilinas, igual que otros antibióticos betalactámicos, inhiben el crecimiento bacteriano mediante la inactivación de las proteínas de unión a penicilina (PBPs, por sus siglas en inglés *Penicillin Binding Proteins*). Las PBPs son enzimas que catalizan los últimos pasos de la formación del peptidoglicano, el cual es el componente principal de la pared celular. Estas han sido clasificadas según la similitud de su secuencia. Neumococo presenta seis clases de PBPs: PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2x, PBP2b y PBP3 (4).

La resistencia a penicilina G en cepas clínicas se ha atribuido principalmente a mutaciones en los genes *pbps2x*, *2b* y *1a*. Además, algunos estudios señalan que están involucradas mutaciones en otros genes, entre los que destaca *murM* (5-7). Dicho gen codifica una enzima que cataliza una reacción clave durante la formación del peptidoglicano (8).

En la presente tesis se determinó la asociación entre la presencia de los genes *pbp2x*, *2b*, *1a* y *murM* alterados y la resistencia en cepas invasivas y colonizadoras de neumococo aislados de niños.

I.1 *Streptococcus pneumoniae*

I.1.1 Clasificación taxonómica:

Dominio: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae

Género: *Streptococcus*

Especie: *Streptococcus pneumoniae* (9)

I.1.2 Características

S. pneumoniae, comúnmente llamado neumococo, es una bacteria Gram positiva, con forma ovalada o de lanceta cuyo tamaño varía entre 0.5-1.25 μm . Se presenta en pares (diplococos) o en cadenas cortas. No forma endosporas ni posee flagelos por lo que no tiene movilidad (10). Además, es un microorganismo quimiorganotrofo, anaerobio facultativo, catalasa negativa y realiza fermentación homoláctica. Las pruebas convencionales para su identificación en el laboratorio son: la morfología de las colonias en agar sangre (en este se observarán pequeñas, grisáceas, acuosas y rodeadas de una zona verdosa de α - hemólisis), la tinción Gram, la prueba de susceptibilidad a optoquina y la prueba de solubilidad en bilis (11).

Asimismo, neumococo posee una cápsula polisacárida, la cual es su principal factor de virulencia que le protege de la fagocitosis y genera una respuesta inmunológica específica (12). Las cepas de *S. pneumoniae* son categorizadas en serotipos basados en la estructura de sus cápsulas, de las cuales se han descrito 98 clases (13).

I.1.3 Infecciones

Streptococcus pneumoniae es una bacteria comensal que coloniza la zona nasofaríngea del ser humano (14), principalmente durante los dos primeros años de vida (15). Sin embargo, puede evadir la barrera inmunológica del huésped y causar diversas enfermedades desde sinusitis, otitis media y bronquitis hasta mucho más graves como bacteremia, meningitis y neumonía. Estas últimas son denominadas enfermedades neumocócicas invasivas (ENI) dado que son producidas cuando las cepas infectan fluidos estériles como la sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y líquido peritoneal (16).

Asimismo, las infecciones neumocócicas están asociadas a un limitado número de serotipos (17).

I.1.4 Epidemiología de enfermedades neumocócicas

Las enfermedades neumocócicas son las principales contribuyentes a la morbilidad y mortalidad en todo el mundo, aunque las tasas más altas de hospitalización y muerte son registradas en los países en desarrollo. Personas en alto riesgo incluyen niños, adultos mayores de 65 años e inmunosuprimidos. Se estima que neumococo causó 8,9 millones

de casos de neumonía, 84 mil casos de meningitis y 300 mil muertes en niños menores de cinco años a nivel mundial en el 2015 (1,18).

En el Perú, *S. pneumoniae* es el patógeno responsable del mayor número de casos de neumonía y meningoencefalitis en niños (19).

I.2 Penicilina

I.2.1 Importancia

Las penicilinas son un grupo de diferentes moléculas que se caracterizan por tener un anillo betalactámico de cuatro miembros nitrogenados en el centro de su estructura, denominado núcleo y la misma actividad antibacterial de bencilpenicilina (penicilina G) – la molécula original extraída de *P. notatum*. Estos antibióticos se distinguen por las cadenas laterales unidas a sus núcleos (Figura 1) y pueden ser naturales o semisintéticas (20).

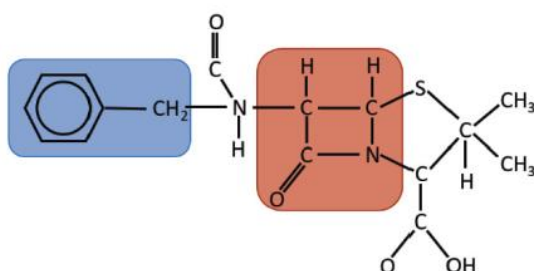


Figura 1. Estructura química de penicilina G (clase bencilpenicilina, 1^{era} generación). El anillo betalactámico, característica común de todas las clases de penicilinas está resaltado en marrón y la cadena sustituta está en color azul, Extraído de Lobanovska y Pilla (2017) (20).

Estas penicilinas han sido el principal medio de tratamiento a infecciones neumocócicas durante décadas debido a su excelente actividad bactericida a bajas concentraciones. Además, tienen buena distribución y escasa toxicidad (21). Los primeros antibióticos como la penicilina G, V y benzatínica, a pesar de tener más de 60 años de uso, son de elección para el tratamiento vía parenteral de meningitis y neumonía comunitaria del adulto por neumococo en el Perú. La amoxicilina, una penicilina semisintética de tercera generación, es usada vía oral en casos de neumonía adquirida en la comunidad (2,22).

I.2.2 Desarrollo de la resistencia a penicilina

La primera detección de cepas de neumococo resistentes a penicilina ocurrió en 1967 en Australia (23) y desde 1980 se han incrementado dramáticamente en todo el mundo (24). Actualmente, se estima que 50% de aislados son resistentes en Latinoamérica, con los más altos porcentajes en México (84.8%) y Venezuela (81.2%) (25).

En el Perú, estudios en niños portadores sanos de Lima reportaron 5% de cepas resistentes en 1997 (26); 15 % en el 2000 (27) y 20% en el 2001 (28); 36 y 37% en el 2003 y 2004, respectivamente (28,29); 47% en el 2008 (30) y 57.4% en 2009 (31). Asimismo, se reportó 27% de resistencia a penicilina en el 2000 (32); 46% en el 2008 (33) y 50% en el 2011 (34) en cepas aisladas de niños con enfermedad neumocócica invasiva (Figura 2). Estos dos últimos datos obtenidos específicamente en cepas meníngeas.

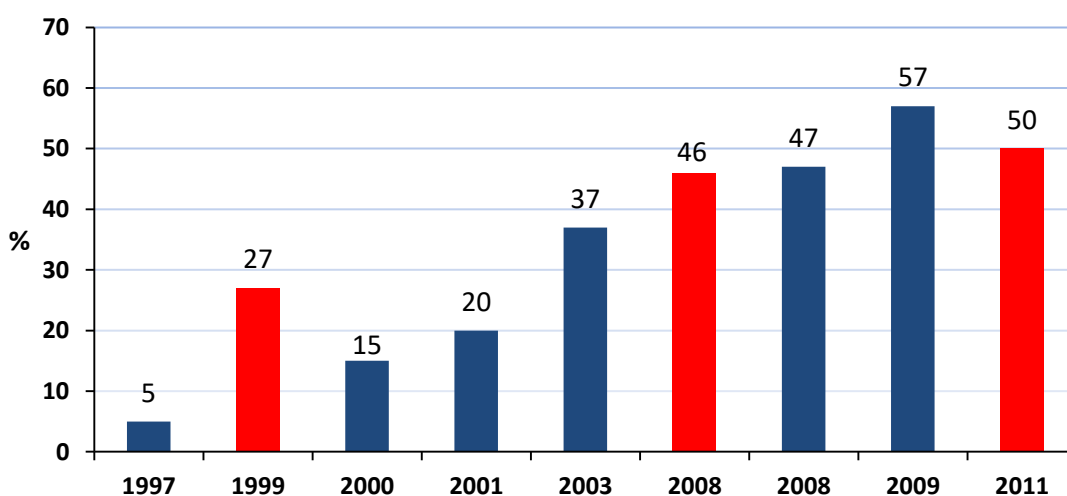


Figura 2. Porcentaje de resistencia a penicilina de cepas de *S. pneumoniae* en los últimos años en Lima. Las barras azules señalan cepas aisladas de niños portadores menores de tres años. Las barras rojas cepas invasivas obtenidas de niños menores de dieciséis años. Esta gráfica fue elaborada a partir de los datos obtenidos de diferentes estudios (26-34).

I.2.3 Métodos para la determinación de la resistencia antimicrobiana

La prueba de difusión de disco con 1µg de oxacilina (ODD por sus siglas en inglés, *oxacillin disk diffusion*) es un método eficaz y comúnmente utilizado en los laboratorios

para la detección de neumococos no sensibles a penicilina. Los puntos de corte establecen que aislados con zonas de inhibición ≥ 20 mm son sensibles y aislados con zonas ≤ 19 mm son no sensibles. En el segundo caso, el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomienda determinar la Concentración Mínima Inhibitoria ya sea mediante el método de microdilución o el método de difusión con tiras de E-test, debido a que dichas zonas pueden ser relacionadas no solo resistencia o intermedio sino incluso susceptibilidad. Es decir, pueden haber casos de cepas que tengan zonas de inhibición igual a 10 mm clasificándolas como no sensibles pero al realizar la determinación del MIC podrían resultar ser sensibles (35).

Respecto a la determinación del MIC, en enero de 2008, después de una reevaluación que incluyó estudios clínicos más recientes, el CLSI publicó nuevos puntos de corte de *S. pneumoniae* para la penicilina distinguiendo cepas de pacientes con o sin meningitis (Tabla 1). Para la mayoría de los casos clínicos, solo los valores de MIC por encima de 2 $\mu\text{g/mL}$ causan dificultades para el tratamiento por lo que se consideró como punto de corte. Sin embargo, la escasa penetración de la penicilina a través de la barrera hematoencefálica hace que los aislados con una MIC superior a 0,06 $\mu\text{g/mL}$ se clasifiquen como resistentes en casos de meningitis (36).

Tabla 1. Puntos de corte para la determinación de resistencia a la penicilina G.

Penicilina parenteral	Sensibles	Intermedio	Resistente
No meníngeas	≤ 2	4	≥ 8
Meníngeas	≤ 0.06	-	≥ 0.12

Las concentraciones del antibiótico están dadas en $\mu\text{g/mL}$ (35).

En una investigación realizada en Canadá en el que se compararon las zonas de inhibición de la prueba ODD con los MICs de la penicilina encontraron que el 98% de las cepas neumocócicas con zonas de inhibición ≤ 19 mm no eran susceptibles a la penicilina (se trabajaron con 1116 cepas se aisladas de fluidos corporales normalmente estériles y del tracto respiratorio). Con base en esos resultados y otro estudios, dicha prueba se ha estado utilizando como un predictor de no susceptibilidad a penicilina. Aunque, cabe recalcar que estas investigaciones utilizaron los anteriores puntos de corte

que establecía; sensibles ≤ 0.06 , intermedio 0.12 -1.0 y resistentes ≥ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ y no distinguía entre cepas meníngeas y no meníngeas (37).

Asimismo, en un estudio en la que se aislaron cepas de *S. pneumoniae* a partir de niños sanos de 2 a 24 meses de edad provenientes de varios hospitales y centros de salud peruanos entre 2007 y 2009, se halló una buena correlación entre las zonas de inhibición del ODD y los puntos de corte meníngeos de la penicilina, pero una correlación débil respecto a no meníngeos. Por lo tanto, la prueba ODD parece ser una herramienta útil para predecir la resistencia a la penicilina en casos de cepas meníngeas de *S. pneumoniae*, particularmente en países de ingresos bajos y medianos, donde la determinación de la MIC no está disponible de manera rutinaria (38).

Además, para cepas no meníngeas un MIC ≤ 0.06 a penicilina G puede predecir susceptibilidad a otros betalactámicos: ampicilina (oral o parenteral), amoxicilina, ceftriaxona, cefepime entre otros (35).

1.2.4 Mecanismos moleculares de resistencia a penicilina G

El peptidoglicano es el principal constituyente de la pared celular de neumococo. Esta capa protege a la bacteria de la presión de turgencia y es un andamio para anclar otras moléculas de la superficie (39). Asimismo, su ensamblaje dinámico es esencial para la división celular y la determinación de la forma de la bacteria (40, 41). El peptidoglicano de neumococo está compuesto por una red multicapa de cadenas de glicano de residuos alternos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico conectados a través de péptidos (39).

Las PBPs son enzimas que catalizan los últimos pasos de la formación del peptidoglicano y están asociadas a la membrana citoplasmática. Neumococo presenta seis PBPs las cuales han sido clasificadas según la similitud de secuencia en tres clases: A, B y C. Las tres PBP clase A (PBP1a, PBP1b y PBP2a) son enzimas bifuncionales que polimerizan cadenas de glucanos (actividad glicosiltransferasa) y las unen a través de enlaces peptídicos (actividad transpeptidasa). Las dos PBP de clase B (PBP2x y PBP2b) son transpeptidasas y PBP3 es un PBP clase C con actividad carboxipeptidasa, la cual está envuelta en la maduración del peptidoglicano (42). Mientras las PBPs de

clase A y C no son esenciales en neumococo (43,44), ambas PBPs de clase B son necesarios: PBP2b es esencial para la elongación y PBP2x para la división (45–49).

Las penicilinas forman un complejo covalente bastante estable con las PBPs vía su sitio activo serina. De esta manera, son enzimáticamente inactivas y por lo tanto se produce la lisis de neumococo (Figura 3) (20, 50,51). La resistencia en el caso de penicilina G se debe principalmente a alteraciones en los dominios transpeptidasa ubicados dentro de los genes *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x*. Estas PBPs alteradas son menos afines a la penicilina y su función no se ve afectada (52). Estudios realizados con cepas clínicas muestran que para conferir un alto nivel de resistencia es necesario mutaciones en los genes *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x* y para conferir resistencia intermedia solo se necesita que uno de ellos esté mutado, aunque la mutación de *pbp1a* se asocia a un mayor valor de MIC. Por otro lado, las dobles mutantes *pbp1a* /2x y *pbp2x*/2b presentan resistencia de menor nivel (53,54).

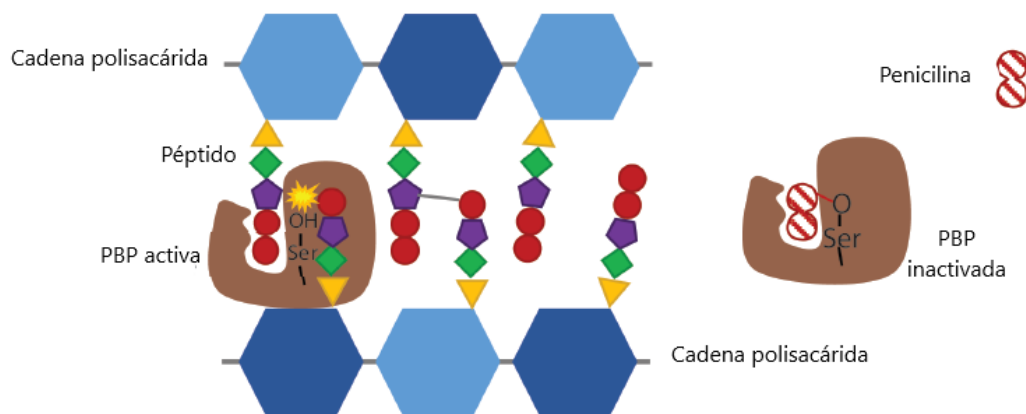


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de acción de penicilina. El peptidoglicano está compuesto de cadenas de polisacáridos hechos de unidades de GlcNAc y MurNAc (mostrados en diferentes tonalidades de azul) los cuales están unidos por pequeños péptidos. La enzima transpeptidasa (PBP) (en marrón) cataliza la unión entre estos péptidos, específicamente uniendo los dos residuos de D-alanina de un péptido (círculos rojos). La penicilina imita la estructura de estos residuos e inactiva las PBPs formando una unión covalente irreversible con el aminoácido serina de la enzima (20).

Las secuencias de ADN del dominio transpeptidasa en cepas de *S. pneumoniae* sensibles a la penicilina están bien conservadas; a diferencia de las cepas resistentes, las

cuales contienen bloques de secuencia de diferentes longitudes que difieren en más del 20%, denominado mutaciones en mosaico (Figura 4). Estas PBP contienen motif de aminoácidos conservados SXXK, SXN y KXG, que son responsables de la actividad transpeptidasa y mutaciones en estas regiones son las confieren resistencia. La longitud de los bloques de mosaico incluyen no solo partes del dominio transpeptidasa sino en algunos casos hasta la región de codificación de la proteína completa como resultado de transferencia de genes con otros *Streptococcus* comensales orales seguidos de eventos de recombinación (52,55-57).

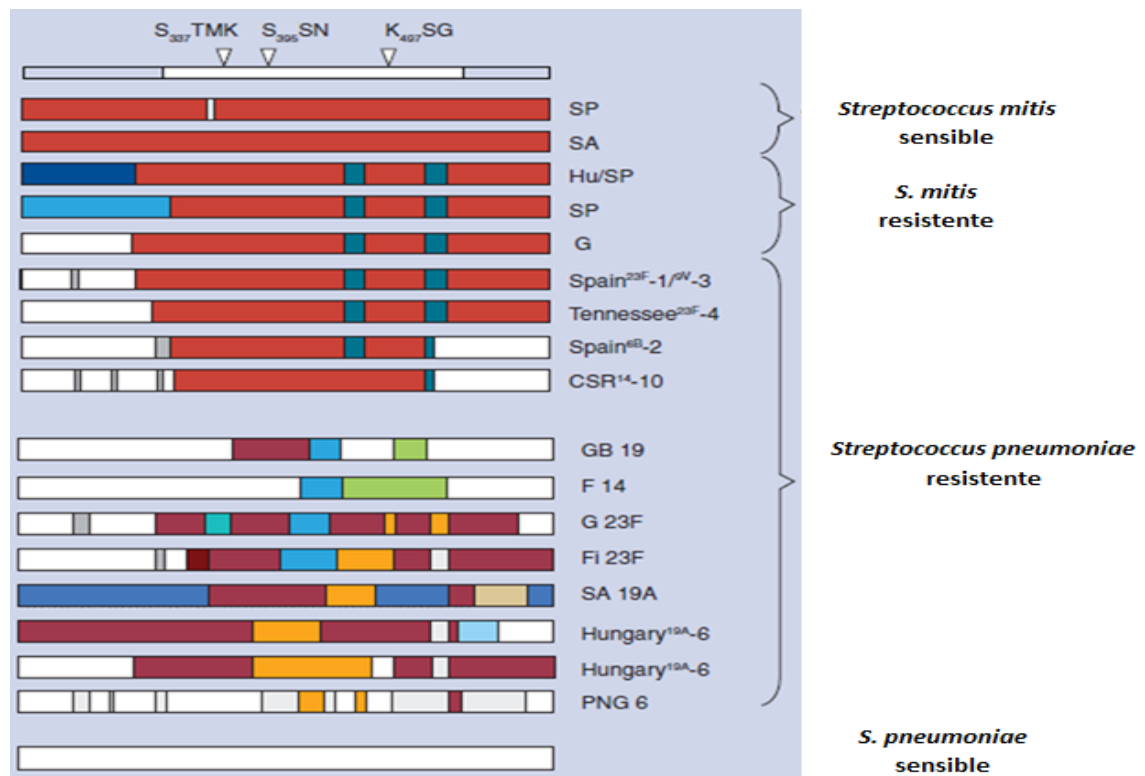


Figura 4. Mutaciones en mosaico de genes *pbp2x* de aislados clínicos. Los diferentes colores indican que las secuencias difieren de todos los demás en aproximadamente 20% (52).

Además de las *pbps*, el gen *murM* que codifica una proteína del mismo nombre ha sido involucrado en la resistencia de neumococo a penicilina. MurM es una enzima que cataliza la transferencia de L-serina o L-alanina a la lisina de la rama peptídica del Lípido II durante la formación del peptidoglicano (58). Algunas cepas resistentes presentaban mutaciones en mosaico en el gen *murM* y contenían una mayor cantidad de muropeptidos en su pared en comparación con cepas sensibles, lo que indica que las

mutaciones incrementan la actividad de MurM (59). En la actualidad se han descrito 10 variantes con considerables polimorfismos en el gen *murM* en cepas resistentes a penicilina, los cuales se han denominado alelos B1 a 10 (58,60). Se ha denominado *murMA* al alelo *murM* sin mutaciones (58).

Du Plessis y equipo señalan que para conferir un alto nivel de resistencia a penicilina en neumococo se requiere tanto de una remodelación extensa de las *pbps* y de ciertas mutaciones del gen *murM*, dado que se podría recuperar por completo la eficiencia en la construcción de la pared celular cuando MurM es alterada (61).

La secuenciación del genoma completo (WGS por sus siglas en inglés, *Whole-genome sequencing*) es una herramienta eficaz para la investigación de la resistencia a los antibióticos; sin embargo, su elevado costo no permite su empleo de rutina, por lo que para este estudio se usó la técnica de PCR como una alternativa viable (62). Cabe señalar que se empleó cebadores que amplifican solo regiones no alteradas dentro de motif conservados del dominio transpeptidasa de las *pbps* y respecto al gen *murM* los cebadores también amplifican secuencias conservadas. (5, 63,64).

I.3 Serotipos y resistencia antibiótica

La introducción de la vacuna neumocócica 7 valente, seguido por la 10 y 13 valente dirigido contra los serotipos más frecuentes altamente virulentos y resistentes a penicilina en los programas nacionales de inmunización de muchos países, resultó en un significativo decrecimiento de infecciones causadas por dichas cepas tanto en niños como en adultos. Sin embargo, se han incrementado las cepas resistentes a antibióticos que expresan serotipos no incluidos en las vacunas debido a la diseminación de genes alterados hacia nuevas clonas, como resultado de la increíble propiedad de transformación genética de neumococo (65-67).

II. Justificación del estudio

Las penicilinas (penicilinas G, V, clemizol y amoxicilina) son la primera opción para el tratamiento de enfermedades neumocócicas (2); sin embargo, la aparición de cepas resistentes es preocupante porque implica la necesidad de terapias de segunda línea, como cefalosporinas y macrólidos, las cuales son más costosas y con mayores efectos secundarios (2). Aunque la incursión de vacunas ha logrado disminuir este problema la

aparición de serotipos no vacunales resistentes requiere que se siga conociendo los mecanismos moleculares (63-65). Por estas razones, la Organización Mundial de la Salud recomienda realizar la vigilancia genómica de la resistencia antibiótica. Entre las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) es la que ha adquirido un mayor valor en la caracterización de los genotipos de resistencia bacterianos (68).

El amplio rango de MIC observado en aislados clínicos indica claramente que no hay un solo mecanismo, como la presencia de una enzima diana especial, sino que la resistencia en *S. pneumoniae* es un complejo proceso multifactorial (52). El presente estudio se enfoca en determinar la presencia de genes *pbps* y *murM* alterados debido a que son los genes más frecuentemente asociados a la resistencia a penicilina en cepas clínicas. Las mutaciones en *pbps2x* son un requisito previo para la resistencia; además, *pbp2b* y *pbp1a* confieren un aumento adicional en el MIC sin cambios en otros genes *pbps* o no *pbps* (53) (54). Asimismo, PBP2x y PBP2b son proteínas esenciales y representan el objetivo principal de las penicilinas. Por otra parte algunas cepas resistentes presentan mutaciones en *murM* el cual al ser bloqueado implica la pérdida del fenotipo de resistencia (5,8).

En la presente tesis se estandarizó dos sistemas de PCR múltiple para detectar la presencia de genes alterados asociados a la resistencia a penicilina.

III. Pregunta de investigación

¿Los genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM* alterados están asociados a la resistencia a penicilina en cepas invasivas y colonizadoras de *S. pneumoniae* aisladas de niños de Lima?

IV. Objetivos

IV.1 Objetivo general

Determinar los mecanismos de resistencia a penicilina en cepas de *S. pneumoniae* aislados de niños con enfermedad neumocócica invasiva y niños portadores sanos de Lima a través del estudio de los genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM*.

IV.2 Objetivos específicos

- Estandarizar un sistema de reacción en cadena de la polimerasa convencional para detectar genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM* alterados.
- Determinar la frecuencia genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM* alterados.
- Comparar la presencia de genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM* alterados entre cepas invasivas y portadoras
- Determinar la correlación entre el número de genes alterados y el MIC.
- Determinar la asociación entre la presencia de los genes *pbps* y *murM* alterados y la resistencia a penicilina.

V. Materiales y métodos

V.1 Población y muestra

Para esta tesis se utilizaron las cepas de *Streptococcus pneumoniae* que fueron colectadas a partir de dos estudios que se realizaron en el Laboratorio de Infectología Pediátrica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El primero es “Determinación de Serotipos y Sensibilidad Antibiótica en pacientes hospitalizados por Enfermedad Neumocócica Invasiva en Lima – ENI III” (Estudio ENI-III) y el segundo es “Distribución de serotipos y sensibilidad antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú” (Estudio portadores II). En ambos casos el muestreo se realizó por conveniencia.

Las cepas fueron identificadas basado en la morfología de la colonia, presencia de alfa hemólisis, coloración Gram, solubilidad en bilis y sensibilidad a la optoquina. Posteriormente fueron criopreservadas en el medio STGG (*skim milk*, soja- triptona, glucosa y glicerol) y almacenadas a -70 °C.

V.1.1 Población para el primer estudio

Cepas de *S. pneumoniae* provenientes de pacientes con ENI (Enfermedad Neumocócica Invasiva) menores de 14 años que fueron internados en diferentes clínicas y hospitales en Lima durante el período noviembre 2016 a mayo del 2019. Se recolectaron un total de 71 cepas correspondieron a niños menores de 14 durante dicho periodo de las cuales 61 fueron no sensibles por el disco oxacilina; sin embargo, 1 cepa no amplificó *lytA* por lo que fue excluida obteniéndose finalmente 60 cepas para este estudio.

Criterio de inclusión

Cepas de *S. pneumoniae* aislados de muestras clínicas normalmente estériles (hemocultivo, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, líquido peritoneal) o cultivo de biopsia de pacientes menores a 14 años con ENI,

Cepas de neumococo no sensibles mediante el método de difusión en disco de oxacilina.

Criterios de exclusión

Cepas que no amplificaron *lytA*. Se utilizó el gen *lytA* que codifica la enzima autolisina específica para neumococo como control interno, dado que la ausencia de bandas indicaba que el gen está mutado. De las cepas invasivas una no amplificó *lytA*, por lo que no fue considerada en los análisis posteriores.

Cálculo de la precisión del tamaño de muestra

Dado que se dispone de una muestra de 60 cepas que cumplen los criterios de inclusión se calculará la precisión del tamaño de la muestra con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{A^2}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

Z=Parámetro estadístico que depende del nivel de confianza

A=Precisión

p = Probabilidad que ocurra el evento estudiado (éxito)

q = Probabilidad que no ocurra el evento estudiado

Basado en un estudio previo, el porcentaje de cepas invasivas resistentes es 46.2% (20). El nivel de confianza es de 95%. Reemplazando:

$$A = \sqrt{\frac{1.96^2 * 0.46 * 0.54}{60}}$$

$$A = 0.1260 = 12.60\%$$

La precisión es de 12.08%. Lo recomendable es menos de 10%.

V.1.2 Población para el segundo estudio

Cepas de neumococo aislados de niños sanos de 2 meses a 2 años de edad, atendidos en la consulta externa de pediatría, control del niño sano o consultorio de vacunación de los hospitales participantes en el estudio colectadas en enero del 2018 hasta julio 2019. De un total de 201 cepas que fueron aisladas durante dicho periodo 150 fueron no sensibles por el disco de oxacilina y de estas 136 amplificaron *lytA*. Para el presente estudio solo se incluyen cepas que amplificaron *lytA*.

Criterio de inclusión

Cepas aisladas de muestras nasofaríngeas de niños sanos de acuerdo a la definición del estudio de niños portadores sanos (quienes no padecen de ninguna enfermedad importante como neumonía probable, sepsis, bacteremia, meningitis/encefalitis) de 2 meses a 2 años de edad que acudieron a sus controles de niño sano en cinco hospitales.

Cepas de neumococo no sensibles mediante el método de difusión en disco de oxacilina.

Criterios de exclusión

Cepas que no amplificaron *lytA*. De las 150 cepas que cumplían los criterios de inclusión, 14 no amplificaron dicho gen.

Cálculo de la precisión del tamaño de muestra

En un estudio previo se calculó que el porcentaje de cepa colonizadoras resistentes a penicilina en Lima es de 57% (32). El número de cepas disponibles es de 136. El nivel de confianza es de 95% por lo que reemplazando en la fórmula anterior se obtiene lo siguiente:

$$A = \sqrt{\frac{1.96^2 * 0.57 * 0.43}{136}}$$

$A=0.0832= 8.19\%$. La precisión de la muestra es de 8.19%

V.2 Extracción de DNA de cepas de *S. pneumoniae*

Las cepas criopreservadas de neumococo fueron reactivadas en agar sangre (TSA suplementado con 5 % de sangre de carnero) e incubadas durante 24 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis. La extracción de ADN se realizó re-suspendiendo las cepas de neumococo en una solución de 200 µl de Chelex-100® (Bio-Rad, Richmond, CA) al 5% suplementado con 2 µl proteinasa K (20 mg/ml), la cual se incubó a 56° C durante 60 minutos, se homogenizó durante 10 segundos y se incubó a 95°C por 15 minutos, se homogenizó y centrifugó a 13 000 rpm durante cinco minutos y se almacenó -20°C hasta su análisis por PCR. La cantidad y calidad del ADN extraído se evaluó en equipo Nano Drop TM Espectrofotómetro ND-10 (Thermo Scientific).

V.3 Estandarización de sistemas de PCR convencional

La determinación de los genes de resistencia fue realizada mediante PCR convencional. Se estandarizó dos sistemas de PCR múltiple; en uno se amplificó los genes *pbp2b*, *pbp1a* y *lytA* y en otro *pbp2x*, *lytA* y *murM*. Se usó la cepa ATCC *Streptococcus pneumoniae* R6 sensible a penicilina que contiene los genes *pbps*, y *murM* no alterados como control positivo. Como control negativo se utilizó solamente el master mix.

V.3.1 Elección de cebadores

Los cebadores utilizados para la detección de los genes *pbp2b*, *pbp2x*, *pbp1a*, *murM* y *lytA* fueron descritos previamente en diferentes estudios (5, 62,63) (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación de los genes de resistencia y *lytA*

Gen		Secuencia 5´ - 3´	Amplicon	Referencia
<i>pbp2b</i>	F	CCTATATGGTCCAAACAGCCT	147pb	(63)
	R	GGTCAATTC CTGTCGCAGTA		
<i>pbp2x</i>	F	CCAGGTTCCTACTATGAAAGTG	197 pb	
	R	ATCCCAACGTTACTTGAGTGT		
<i>pbp1a</i>	F	AAACCGCGACTGGGGATCAAC	239 pb	(64)
	R	GGTTGAGTCCGACCTTGTTT		
<i>murM</i>	F	GCTGGATCCCATGAGAAGTTTGGTGTTTA	423 pb	(5)
	R	GCTGAATTCCTGTTCGAATAGCCTGTT		
<i>lytA</i>	F	CAACCGTACAGAATGAAGCGG	297 pb	(63)
	R	TTATTCGTGCAATACTCGTGCG		

Los cebadores elegidos para este estudio amplifican secuencias conservadas que están cerca del *motif* de aminoácidos del dominio transpeptidasa de los genes *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* que son altamente divergentes en cepas resistentes (62,63) Los cebadores respecto a *MurM* también amplifican regiones conservadas que presentan mutaciones en mosaico en cepas resistentes (5). Mediante el programa bioinformático BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) se pudo identificar la ubicación de los primers analizados en la secuencia de los genes *pbps* y *murM* de la cepa de referencia de *Streptococcus pneumoniae* R6. Cabe recalcar que estos cebadores no se unen a regiones reguladoras o regiones repetitivas en los cuatro genes (Anexo 1).

Asimismo, para verificar que la ausencia de bandas se deba a la presencia de mutaciones y que no haya inhibidores dado que no se purificó el material genético obtenido se amplificó simultáneamente el gen *lytA*, que codifica la enzima autolisina, junto con los otros genes.

V.3.2 Preparación del master mix para la prueba de PCR

El PCR se realizó en 20 µl de master mix que contenía 2mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs, 32.5mU/ul polimerasa termoestable (GoTaq® G2 Flexi suplementada con buffer verde Green, marca Promega) y 0.5mM de cada primer en el caso del primer sistema de PCR triplex 1(Anexo2) y en el caso del segundo sistema de PCR triplex 2 se utilizó diferentes concentraciones (Anexo 3) y 2 µL de la muestra de ADN. Se procedió a su homogenización utilizando un vortex para asegurar la mezcla de los reactivos.

V.3.3 Amplificación del ADN

El PCR para la amplificación de ambos sistemas (triplex 1 y 2) se realizó según las siguientes condiciones de termociclado, desnaturalización inicial a 95 °C durante 2min, desnaturalización a 95 °C por 15s, hibridación a 60 °C por 20s, extensión a 72°C por 30s y la extensión final por 72°C a 7 min (Anexo 4).

V.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN amplificados fueron analizados en un gel de agarosa al 2.5%. Esta concentración de agarosa demostró ser la adecuada para una buena resolución de los productos de amplificación de los genes dado que tamaño de los amplicones eran

muy cercanas entre sí. Se utilizó bromuro de etidio para la tinción del gel y la imagen se visualizó en un fotodocumentador (BioRad). Se empleó el marcador de 100 pb para estimar los productos de amplificación. La presencia de productos de amplificación (bandas) en el gel de agarosa se observaron en las cepas que no presentaban los genes *pbps 2x*, *2b*, *1a* y *murM* alterados. Todas las cepas que presentan la banda de *lyt A* representan a cepas de neumococo.

V.4 Análisis estadístico

Se usó el test de Fisher para establecer asociación entre el número de genes alterados y la resistencia (no sensibles). También se empleó la prueba de Spearman para establecer correlación entre el número de genes alterados y el MIC y para comparar entre los grupos se utilizó a la prueba de Kruskal-Wallis. Se emplearon dichas pruebas no paramétricas porque los valores de MIC no presentaban una distribución normal. Las diferencias fueron consideradas significativamente cuando el valor de *p* fue menos que 0.05. Todos análisis fueron realizados usando el Programa Stata/SE versión 17.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

VI. Resultados

VI. 1 Estandarización de PCR multiplex

Se estandarizó dos sistemas de PCR trioplex; en uno se amplificó los genes *murM*, *lytA*, *pbp2x* (trioplex 1) y en otro *pbp1a*, *pbp2b* y *lytA* (trioplex 2 (Figura 5). La interpretación de los resultados de PCR fue la siguiente, si las bandas eran visibles, representaba que no tenían los genes alterados. Cabe recalcar que las bandas se lograron observar con nitidez y no hubo bandas inespecíficas.

Con el fin de conseguir el mejor sistema de PCR, en primer lugar, se realizó PCR simplex a los genes *pbps*, *murM* y *lytA* con diferentes temperaturas de hibridación obteniéndose una buena amplificación en todos los casos a 60°C (Anexo 5). Después se evaluaron 3 sistemas dúplex *pbp1a-pbp2x*, *pbp2x-pbp2b*, *pbp1a-pbp2b* se realizó esta combinación de genes debido a que el tamaño de sus secuencias eran parecidas. También se realizó el triplex *pbp1a-pbp2b-pbp2x* observándose una correcta distancia entre las bandas (Anexo 6), pero cuando se amplificaron junto a *lytA* y *murM* no hubo presencia de todas las bandas. Dado que se observó una mayor separación entre *pbp1a-*

pbp2b se consideró que se amplificaran juntos optándose finalmente por la siguiente combinación de genes *lytA-pbp1a-pbp2b*, *murM-lytA-pbp2x*.

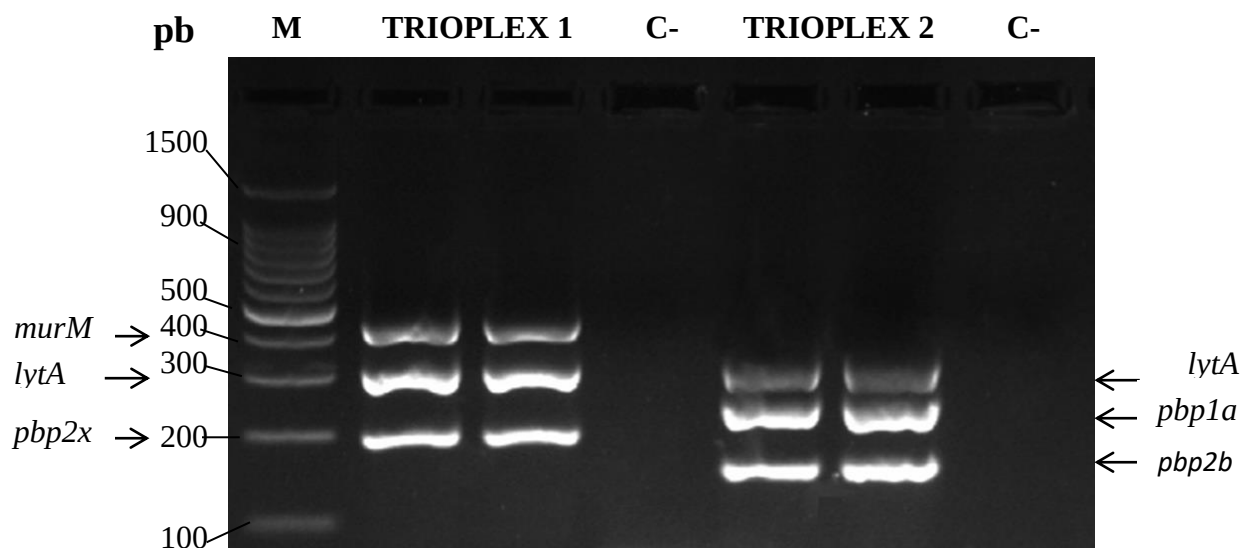


Figura 5. Amplificación de genes tipo salvaje mediante electroforesis en gel de agarosa. Trioplex 1: *murM*, *lytA*, *pbp2x*, trioplex: 2 *lytA*, *pbp1a* y *pbp2b*, M: marcador de peso molecular, C-: control negativo (master mix). Concentración de agarosa al 2.5%, voltaje: 80 v, tiempo: 50 min.

VI.2 Genes *pbps* y *murM* alterados en cepas invasivas y colonizadoras

Se analizó la presencia de genes *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* y *murM* alterados en 60 y 136 aislados de *S. pneumoniae* obtenidos de muestras de diversos sitios estériles y de hisopado nasofaríngeo respectivamente.

El 96.7% (58/60) de cepas invasivas y el 93.4% (127/136) de colonizadoras presentaron el gen *pbp2x* alterado. Las cepas con *murM* alterado fueron menos frecuentes en ambos grupos, 5.0% (3/60) y 13.2%(18/136) en cepas invasivas y portadoras respectivamente. La alteración en *pbp2b* resultó ser más prevalente en cepas colonizadoras que invasivas; caso contrario, se observó respecto a *pbp1a* alterado (Tabla 3). Asimismo, la mayor proporción de cepas invasivas y colonizadoras presentaron tres genes *pbps* alterados, pocas cepas presentaron los cuatro genes alterados. Un bajo porcentaje de cepas no presentaron alteraciones (Tabla 4).

Tabla 3. Frecuencia de genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM* alterados

Gen	Cepas invasivas	Cepas colonizadoras
	N=60 n (%)	N=136 n (%)
<i>pbp2x</i>	58 (96.7%)	127(93.4%)
<i>pbp2b</i>	42(70.0%)	120(88.2%)*
<i>pbp1a</i>	51(85.0%)	81 (59.6%)*
<i>murM</i>	3(5.0%)	18(13.2%)

* $p < 0.05$ según test de proporciones.

Tabla 4. Número de genes *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* y *murM* alterados

Número de genes alterados	Cepas invasivas	Cepas colonizadoras
	N=60 n (%)	N=136 n (%)
No alterado	2 (3.3%)	7(5.1%)
1 gen alterado	2(3.3%)	5(3.7%)
2 genes alterados	19(31.7%)	39(28.7%)
3 genes alterados	34(56.7%)	77(56.6%)
4 genes alterados	3(5.0%)	8(5.9%)

Basados en los resultados de PCR, las cepas invasivas fueron clasificadas en seis grupos de acuerdo a los siguientes genotipos: No alterados, *pbp2x* alterado y las otras combinaciones de genes anormales *pbp1a/pbp2x*, *pbp2x/pbp2b*, *pbp1a/pbp2b/pbp2x* y los cuatro genes alterados. Por otra parte, respecto a las cepas colonizadoras se identificó nueve grupos: No alterados, cepas con *pbp2x* alterado, una cepa con *pbp2b* alterado y cepas con diversas combinaciones de genes alterados *pbp1a/pbp2x*, *pbp2x/pbp2b*, *pbp2x/pbp2b/murM*, *pbp1a/pbp2b/murM*, *pbp1a/pbp2b /pbp2x* y todos los genes alterados (Tabla 5).

Tres genotipos *pbp2b*, *pbp1a/pbp2b* y *pbp2b/murM/pbp2x* alterados fueron identificados solamente en las cepas colonizadoras. En ambos grupos, la presencia de los tres genes *pbps* alterados fue el genotipo más frecuente (Tabla 5).

Tabla 5. Genotipos alterados en cepas invasivas y colonizadoras.

Genotipo	Cepas invasivas	Cepas colonizadoras
	N=60 n (%)	N=136 n (%)
No alterado	2 (3.3%)	7(5.1%)
<i>pbp2x</i>	2 (3.3%)	4(2.9%)
<i>pbp2b</i>	-	1(0.7%)
<i>pbp1a/pbp2x</i>	14 (23.3%)	5(3.7%)
<i>pbp2x/pbp2b</i>	5 (8.3%)	33(24.3%)
<i>pbp1a/pbp2b</i>	-	1 (0.7%)
<i>pbp2b/murM/pbp2x</i>	-	10(7.4%)
<i>pbp1a/pbp2b/pbp2x</i>	34(56.7%)	67(49.3)
<i>pbp1a/pbp2b/pbp2x/murM</i>	3(5.0%)	8(5.9%)

Asimismo, se evaluó si hay diferencias en el valor de MIC de acuerdo a si esta mutado o no (Tabla 6). Tanto en cepas colonizadoras como invasivas se encontró diferencias significativas ($p<0.05$) en el MIC entre tener mutado o no los genes *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x* pero no en respecto a *murM*.

Tabla 6. Mediana de MIC de penicilina según presencia de genes alterados o no.

		Cepas colonizadoras N=136		Cepas invasivas N=60	
Gen		MIC*	<i>p</i>	MIC	<i>p</i>
<i>pbp1a</i>	no alterado	0.38 (0.25-0.75)	0.0001	0.08 (0.02-0.19)	0.0001
	alterado	0.50 (0.38- 2.00)		1.00 (0.38- 2.00)	
<i>pbp2b</i>	no alterado	0.22 (0.06-0.63)	0.0006	0.25 (0.19-0.50)	0.0001
	alterado	0.50 (0.38-1.50)		1.50 (0.75-3.00)	
<i>murM</i>	no alterado	0.50 (0.25-1.00)	0.9379	1.50 (0.50-3.00)	0.2909
	alterado	0.50 (0.38-0.75)		1.00 (1.00-3.00)	
<i>pbp2x</i>	no alterado	0.06 (0.05-0.09)	0.0001	0.02(0.02-0.02)	0.0184
	alterado	0.50 (0.38-1.00)		1.00 (0.25-2.00)	

* Mediana (p25-p75). Los valores de MIC están en µg/mL.

VI.3 Correlación de la susceptibilidad antimicrobial y resultado de PCR.

Las cepas invasivas sin ningún gen alterado presentaron una MIC menor a 0.016 µg/ml, por otro lado, las cepas colonizadoras sin genes alterados presentaron un rango de MIC más amplio que va desde 0.016 hasta 0.094 µg/ml; como se puede observar en las Figuras 6 y 7 que muestran la distribución de MIC acorde a los genotipos identificados en cepas invasivas y colonizadoras respectivamente. Asimismo se puede observar que en ambos grupos la mayor proporción de cepas con MIC alto presentaron los 3 *pbps* alterados; en el caso del primer grupo va en rango de 0.023-8 µg/ml y en el segundo de 0.19-4 µg/ml.

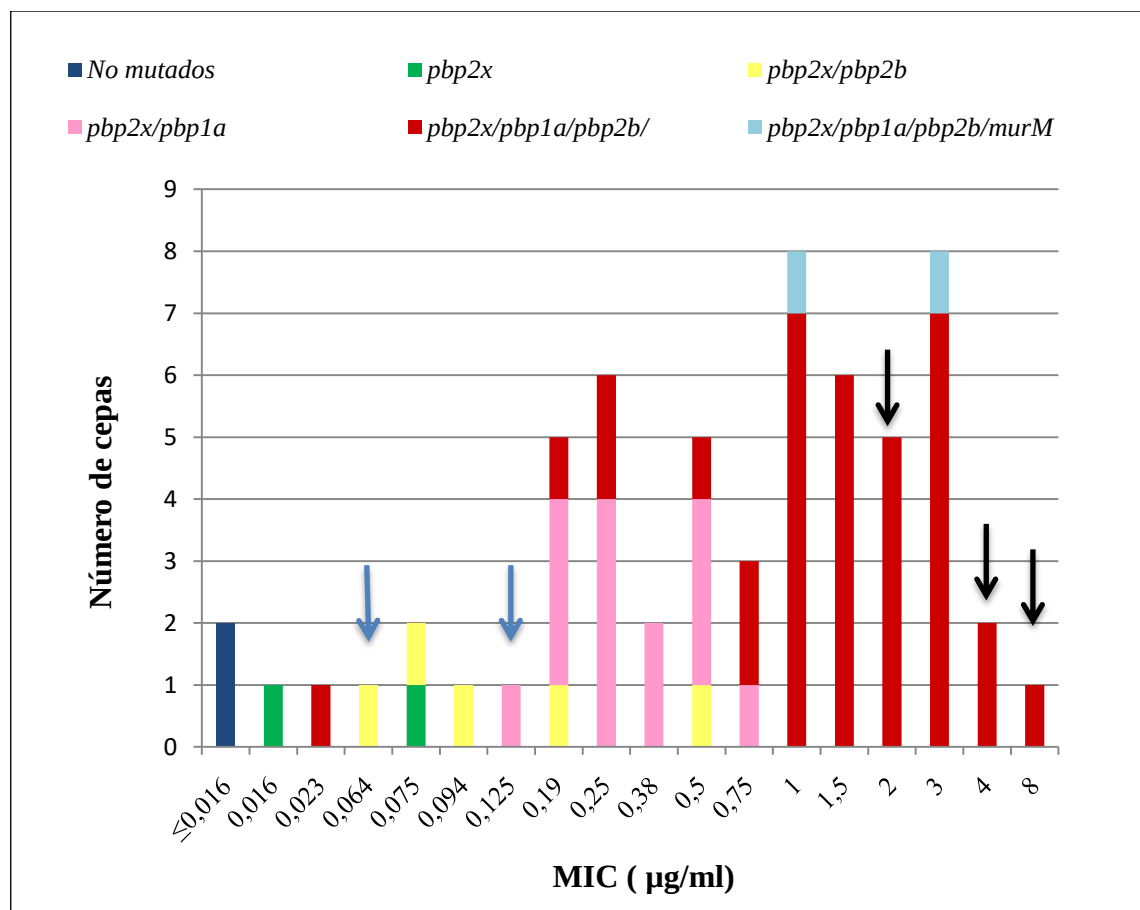


Figura 6. MIC de penicilina G según los genotipos identificados por PCR convencional en cepas invasivas de *S. pneumoniae* (N=60). Las flechas negras indican los puntos de corte para cepas no meníngeas: sensibles ≤ 2 , intermedio 4 y resistentes ≥ 8 . Las flechas azules indican los puntos de corte para cepas meníngeas sensibles ≤ 0.06 y resistentes ≥ 0.12 .

Las cepas colonizadoras con mutación solo en *pbp2x* presentaron un mayor MIC a diferencia de las cepas invasivas, similar resultado se observó con el genotipo *pbp2x/pbp2b* mutado. El genotipo *pbp1a/pbp2x* presento un amplio rango de valores desde 0,125-2 µg/ml en cepas invasivas.

Asimismo, se realizó la prueba de Spearman con el fin de evaluar la correlación entre el número de genes y los valores de MIC a penicilina. Tanto cepas invasivas ($r_s = 0.7108$, $p = 0.0001$) como colonizadoras ($r_s = 0.3430$, $p = 0.0001$), presentaron una correlación positiva significativa.

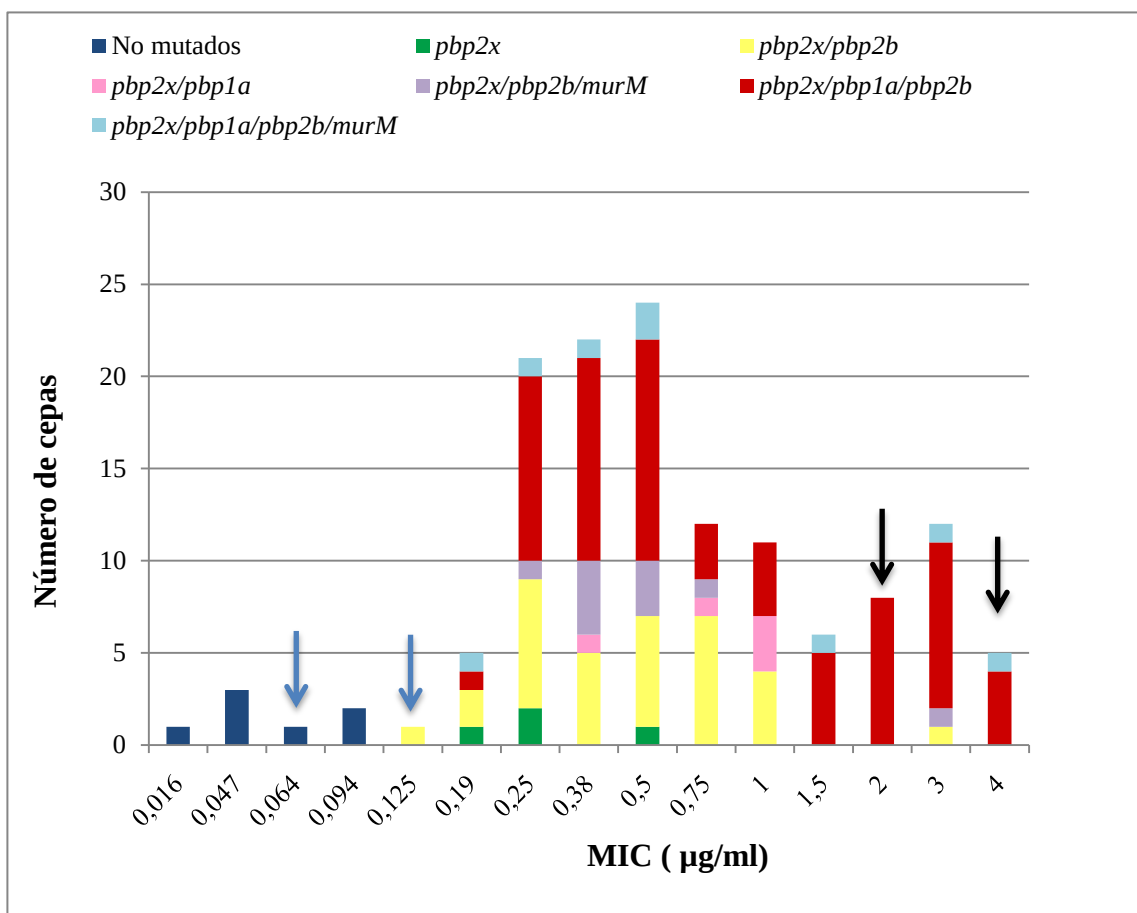


Figura 7. MIC de penicilina G según los genotipos identificados por PCR convencional en cepas colonizadoras de *S. pneumoniae* (N=136). Las flechas negras indican los puntos de corte para cepas no meníngeas: sensibles ≤ 2 , intermedio 4 y resistentes ≥ 8 . Las flechas azules indican los puntos de corte para cepas meníngeas sensibles ≤ 0.06 y resistentes ≥ 0.12 .

VI.4 Asociación entre la presencia de genes alterados y la resistencia a penicilina G

Para determinar la asociación entre el número de genes alterados y la resistencia se agruparon las 60 cepas invasivas y las 136 cepas colonizadoras resultando un total de 196 las cuales fueron clasificadas en sensible y no sensibles según los puntos de corte de MIC para cepas meníngeas y no meníngeas.

De acuerdo a los puntos de corte no meníngeos la mayoría de cepas 85.7% (168/196) fueron sensibles a penicilina, de las cuales 5.4% (9/168) de cepas no presentaron ningún gen alterado y 86.3% (145/168) tuvieron 2 o 3 genes alterados; respecto a las cepas resistentes la mayor proporción, 24 (12%) presentaron 3 genes alterados. Cuando se utilizó los puntos de corte meníngeos, se observó que 94.9% (186/196) (94.9%) de cepas fueron resistentes de las cuales solo dos presentaron amplificación en todos los genes y la mayor proporción de estas tuvieron tres genes alterados, 59.1 % (110/186) (Tabla 7).

Tabla 7. Asociación entre el número de genes alterados y la resistencia según los puntos de corte para cepas meníngeas y no meníngeas.

	Punto de corte meníngeo*		Punto de corte no meníngeo	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
Número de genes alterados	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	10 (5.1)	186 (94.9)	168 (85.7)	28(14.3)
Ningún gen alterado	7(70.0)	2 (1.1)	9(5.4)	0
1 gen alterado	1(10.0)	6(3.2)	7(4.2)	0
2 genes alterados	1(10.0)	57(30.6)	58(35.2)	1(3.6)
3 genes alterados	1(10.0)	110(59.1)	87(51.7)	24(85.7)
4 genes alterados	0	11(5.9)	8(4.8)	3(10.7)

Los puntos de corte de MIC según el CLSI son las siguientes; cepas no meníngeas: sensibles ≤ 2 , intermedio 4 y resistentes ≥ 8 . Cepas meníngeas: sensibles ≤ 0.06 , resistentes ≥ 0.12 . Valor de $p < 0.05$ según test de Fisher.*

Asimismo, al comparar el efecto del número de genes alterados en el valor del MIC se encontró que las cepas que no presentan genes alterados tienen uno o dos presentan

valores de MIC menores comparados a los que tienen 3 o 4 (Figura 8). Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias significativas entre el número de genes alterados respecto al MIC con un valor de $p=0.0001$.

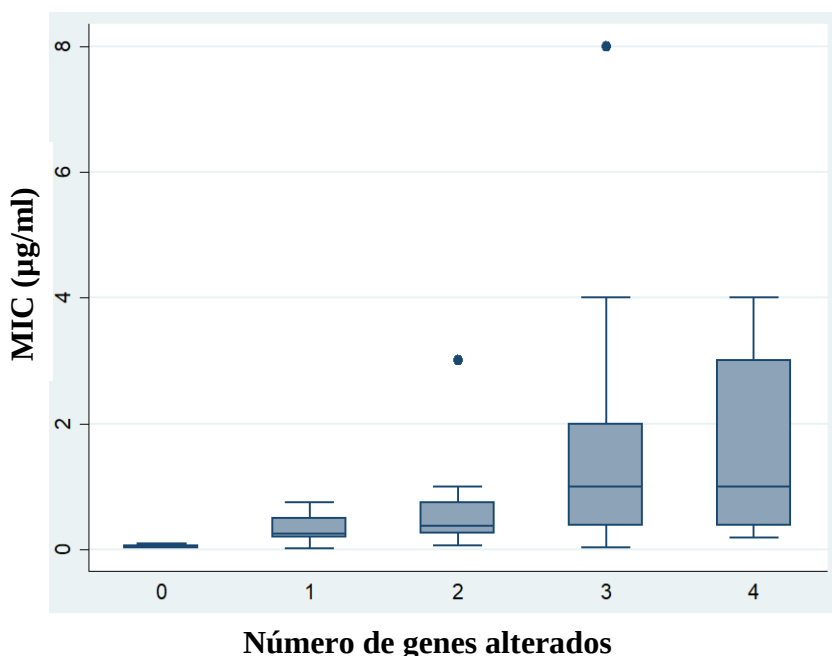


Figura 8. Valores de MIC (µg/ml) según el número de alterados (N=196).

VII. Discusión

Cuando se introdujo la penicilina en 1942, el neumococo era sensible a este antibiótico con un MIC de alrededor de 0.01 mg/ml. Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* no sensibles a la penicilina se detectaron por primera vez en la década de 1960 (68) y ahora son comunes en todo el mundo, debido principalmente a la propagación de los serotipos 14, 23F, 19F, 19A, 9V y 6B que son altamente virulentos y a su vez resistentes a penicilina (67).

En la presente tesis se logró estandarizar dos PCR multiplex para la detección de los principales genes asociados a la resistencia a penicilina; en uno de ellos se amplificaron los genes *murM*, *lytA*, *pbp2x* (trioplex 1) y en otro *lyt*, *pbp1a* y *pbp2b* (trioplex 2). Se utilizó el gen *lytA* como control interno, dado que la ausencia de bandas indicaba que el gen está mutado. Dichos sistemas de PCR son una contribución importante para la investigación de mecanismos de resistencia en neumococo dado que a diferencia de otros estudios este incluye la detección de alteraciones en el gen *murM* (5,63-64).

Todas las cepas de este estudio eran no sensibles a penicilina según el disco de oxacilina; es decir, se seleccionaron aislados con zonas de inhibición ≤ 19 mm, debido a que dichas zonas se relacionan generalmente a resistencia, aunque también a susceptibilidad cuando se realiza posteriormente la determinación del MIC. Sin embargo, el porcentaje de resistencia antibiótica según el MIC fue baja cuando las cepas de este estudio fueron clasificadas según los puntos de corte para cepas no meníngeas. Lo cual indica que hay una sobreestimación de la resistencia según el método del disco de oxacilina, observándose lo contrario cuando se aplica los puntos de corte meníngeos. Este resultado coincide con la investigación realizada por Horna et al. (2016), en la que se halló una buena correlación entre las zonas de inhibición del ODD y los puntos de corte meníngeos de la penicilina, pero una correlación débil respecto a no meníngeos (38).

La mayoría de cepas tanto invasivas como colonizadoras presentaron el gen *pbp2x* alterado siendo los porcentajes 96.9% y 93.3% respectivamente. Se ha propuesto que las cepas que presentan susceptibilidad a la penicilina y zonas de inhibición de ODD reducidas tienen alteraciones en la proteína PBP2X. Estas alteraciones solo causarían un ligero efecto en el MIC de penicilina, que se esperaría que permaneciera por debajo de los puntos de corte, pero podría producir un efecto visible en los resultados de oxacilina; este mecanismo se describió en un estudio realizado por Dowson et al. en 1994 (70). Asimismo, estos resultados coinciden con un estudio realizado con cepas aisladas principalmente de esputo tanto de niños como adultos en Japón, cabe señalar que en esta investigación se utilizaron los mismos cebadores que en esta tesis; en el cual el 79.8% de cepas de un total de 328 presentaron el gen *pbp2x* mutado (64). También coinciden con dos estudios realizados en Japon en el 2006 y 2012 (71,72). El uso intensivo de la terapia con penicilinas como amoxicilina y cefalosporinas de tercera generación en los últimos años podrían haber jugado un papel en la creación de una presión de selección que permitió el desarrollo de neumococos con susceptibilidad reducida a la penicilina debido a que dichos antibióticos son altamente efectivos inhibiendo *pbp2x* (73,74).

Todos los genotipos alterados que se identificaron en ambos grupos incluyen *pbp2x*, lo cual coincide con el resultado de varios estudios en que se observaron que estas mutaciones son el primer paso hacia altos niveles de resistencia a los antimicrobianos sin cambios en otros genes *pbps* o *no-pbps* (52). Asimismo, la alteración en *pbp2b*

resultó ser más prevalente en cepas colonizadoras que invasivas; caso contrario, se observó respecto a la alteración de *pbp1a*, lo cual coincide con los estudios realizados en aislados de cepas de la zona nasofaríngeas y de pacientes con IPD en niños de Japón (71,72).

Alteraciones tanto en *pbp2x* y *pbp2b* son requeridos para elevar el MICs a todas las penicilinas. También se ha observado que cambios adicionales a *pbp1a* son necesarios para conferir alto nivel de resistencia tanto a penicilinas y cefalosporinas (75, 76).

Por otro parte, la presencia de *murM* alterado fue menos frecuentes en ambos grupos. Respecto a nuestra investigación; aunque en el caso de las cepas invasivas se obtuvo valores altos de MIC de 8 y 4 mg/ml estas no presentaron el gen *murM* alterado, pero si hubo cepas que presentaron los cuatro genes alterados con MIC de 1 y 3 mg/ml. Asimismo, las cepas colonizadoras presentaron un MIC promedio 0.925, si bien algunas presentaron un MIC de hasta 4 mg/ml no tuvieron a *murM* mutado. Por lo tanto la presencia de dicho gen alterado no incrementa el valor de MIC. En el año 2001 se reportó por primera vez a las mutaciones en *murM* como un factor clave en la alta resistencia de la cepa húngara 3191 que presentaba un MIC de 16 y 4 mg/ml para penicilina y cefotaxime respectivamente (58). Un estudio reveló que la cepa de *S. pneumoniae* Serotipo 19A aislado en Hungría altamente resistente a penicilina presentaba también *murM* mutado así como de *pbp2x*, *pbp1a* (77). Por estas investigaciones se esperaba que las cepas con mayor valor de MIC tengan *murM* alterado lo cual no coincidió con los resultados hallados en el presente estudio.

Todas las cepas de este estudio eran no sensibles a penicilina según el disco de oxacilina; es decir, se seleccionaron aislados con zonas de inhibición ≤ 19 mm, debido a que dichas zonas se relacionan generalmente a resistencia, aunque también a susceptibilidad cuando se realiza posteriormente la determinación del MIC. Sin embargo, el porcentaje de resistencia antibiótica según el MIC fue baja cuando las cepas de este estudio fueron clasificadas según los puntos de corte para cepas no meníngeas. Lo cual indica que hay una sobreestimación de la resistencia según el método del disco de oxacilina, observándose lo contrario cuando se aplica los puntos de corte meníngeos. Este resultado coincide con la investigación realizada por Horna et al. (2016), en la que se halló una buena correlación entre las zonas de inhibición del ODD y los puntos de

corte meníngeos de la penicilina, pero una correlación débil respecto a no meníngeos (38).

La mayoría de cepas tanto invasivas como colonizadoras presentaron el gen *pbp2x* alterado siendo los porcentajes 96.9% y 93.3% respectivamente. Se ha propuesto que las cepas que presentan susceptibilidad a la penicilina y zonas de inhibición de ODD reducidas tienen alteraciones en la proteína PBP2X. Estas alteraciones solo causarían un ligero efecto en el MIC de penicilina, que se esperaría que permaneciera por debajo de los puntos de corte, pero podría producir un efecto visible en los resultados de oxacilina; este mecanismo se describió en un estudio realizado por Dowson et al. en 1994 (70). Asimismo, estos resultados coinciden con un estudio realizado con cepas aisladas principalmente de esputo tanto de niños como adultos en Japón, cabe señalar que en esta investigación se utilizaron los mismos cebadores que en esta tesis; en el cual el 79.8% de cepas de un total de 328 presentaron el gen *pbp2x* mutado (64). También coinciden con dos estudios realizados en Japon en el 2006 y 2012 (71,72). El uso intensivo de la terapia con penicilinas como amoxicilina y cefalosporinas de tercera generación en los últimos años podrían haber jugado un papel en la creación de una presión de selección que permitió el desarrollo de neumococos con susceptibilidad reducida a la penicilina debido a que dichos antibióticos son altamente efectivos inhibiendo *pbp2x* (73,74).

Todos los genotipos alterados que se identificaron en ambos grupos incluyen *pbp2x*, lo cual coincide con el resultado de varios estudios en que se observaron que estas mutaciones son el primer paso hacia altos niveles de resistencia a los antimicrobianos sin cambios en otros genes *pbps* o *no-pbps* (52). Asimismo, la alteración en *pbp2b* resultó ser más prevalente en cepas colonizadoras que invasivas; caso contrario, se observó respecto a la alteración de *pbp1a*, lo cual coincide con los estudios realizados en aislados de cepas de la zona nasofaríngeas y de pacientes con IPD en niños de Japón (71,72).

Alteraciones tanto en *pbp2x* y *pbp2b* son requeridos para elevar el MICs a todas las penicilinas. También se ha observado que cambios adicionales a *pbp1a* son necesarios para conferir alto nivel de resistencia tanto a penicilinas y cefalosporinas (75, 76).

Por otro parte, la presencia de *murM* alterado fue menos frecuentes en ambos grupos. Respecto a nuestra investigación; aunque en el caso de las cepas invasivas se obtuvo

valores altos de MIC de 8 y 4 mg/ml estas no presentaron el gen *murM* alterado, pero si hubo cepas que presentaron los cuatro genes alterados con MIC de 1 y 3 mg/ml. Asimismo, las cepas colonizadoras presentaron un MIC promedio 0.925, si bien algunas presentaron un MIC de hasta 4 mg/ml no tuvieron a *murM* mutado. Por lo tanto la presencia de dicho gen alterado no incrementa el valor de MIC. En el año 2001 se reportó por primera vez a las mutaciones en *murM* como un factor clave en la alta resistencia de la cepa húngara 3191 que presentaba un MIC de 16 y 4 mg/ml para penicilina y cefotaxime respectivamente (58). Un estudio reveló que la cepa de *S. pneumoniae* Serotipo 19A aislado en Hungría altamente resistente a penicilina presentaba también *murM* mutado así como de *pbp2x*, *pbp1a* (77). Por estas investigaciones se esperaba que las cepas con mayor valor de MIC tengan *murM* alterado lo cual no coincidió con los resultados hallados en el presente estudio.

Hubo asociación entre el número de genes alterados y la resistencia solo cuando se emplearon puntos de corte meníngeos. De acuerdo a este punto, de las 186 cepas resistentes, solo 2 no presentaron los genes alterados y 110 tuvieron 3 genes alterados. Este resultado coincide con lo hallado en dos estudios. En uno se trabajó con 148 cepas de neumococo de varios países mayormente de EEUU, donde se identificó que de las 47 cepas resistentes, 41 (87.2%) tuvieron las 3 *pbps* alteradas, 6 (12.8%) tuvieron alterado *pbp1a* y *pbp2x*. 38(86.4%) de las 44 cepas susceptibles a penicilinas tuvieron *pbps* no alterados, mientras solo 6 aislados (13.6%) tuvieron 1 o dos alteraciones. Cabe recalcar que esta investigación se usó los siguientes puntos de corte que desde el 2008 ya no se aplican que definían sensibles, intermedio y resistente como ≤ 0.06 , 0.12-1 y ≥ 2 mg/L respectivamente (63). Asimismo, según otro estudio en el que se detectaron *pbps* alterados en 101 cepas invasivas aisladas de niños menores de 16 años hospitalizados en Lima entre 2006 y 2008; las cepas meníngeas consideradas resistentes presentaban alteraciones mientras que las susceptibles aún conservaban sus *pbps* sin modificación 20/21 (95%), en cuanto a las cepas no meníngeas más de la mitad de susceptibles tenían al menos un gen *pbp* alterado 34/57 (60%), de los cuales la mayoría de los aislamientos tenían los tres genes *pbps* alterados (78).

Las figuras 7 y 8 muestran la distribución de MIC acorde a los resultados de PCR con el fin de comparar la influencia de cada alteración. Las cepas invasivas sin ningún gen alterado presentaron una MIC menor a 0.016 μ g/ml, por otro lado, las cepas

colonizadoras sin alteraciones presentaron un rango más amplio que va desde 0.016 hasta 0.094 µg/ml. Asimismo, se observó una buena correlación positiva entre los valores de MIC y el número de genes *pbp* alterados. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado con cepas peruanas antes mencionado en la cual la mayoría de las cepas 42/48 (88%) con valores de MIC de penicilina en el rango bajo (0,003-0,064 ug / mL) no tenían ningún gen *pbp* alterado; mientras que la mayoría de las cepas 39/45 (87%) con valores de MIC de penicilina en el rango alto (0,5-32 ug / mL) tenían los tres genes *pbps* alterados (78). La correlación observada en esta tesis también coincide con los estudios realizados en Japón (63,64).

La extensa variación de niveles de susceptibilidad a penicilina que se observa en el presente estudio evidencia la compleja genética de resistencia de *S. pneumoniae* descrita ya en otras publicaciones, en la cuales indican que el desarrollo de resistencia puede ser influenciado por mutaciones en otros genes *pbps* y no *pbps*. De hecho, proteínas PBP1b y PBP2a de baja afinidad a penicilina han sido reportadas previamente. Estudios señalan que cepas altamente resistentes tenían alteradas hasta cinco de las seis proteínas neumocócicas que se unen a la penicilina (52).

El alto número de cepas con *pbps* alterados en cepas invasivas y colonizadoras se puede deber al intercambio de material de genético entre neumococo con otras especies y a mutaciones compensatorias. La colonización de la nasofaringe es un paso importante para el desarrollo de resistencia antimicrobiana debido a que proporciona el ambiente para la interacción entre neumococo y otros estreptocócicos comensales como *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mitis*. Aunque estas especies no son naturalmente resistentes al parecer las alteraciones que confieren la no sensibilidad a la penicilina han surgido como una variación neutral, o surgieron bajo presión de selección, en estas especies donantes antes de ser importadas a *S. pneumoniae* a través de la transformación. *S. mitis* es un donante neumocócico más frecuente de fragmentos de *pbps* y una fuente de mayor diversidad de nucleótidos en comparación con *S. oralis*. Los neumococos que adquirieron fragmentos de *pbps* presentaron un valor de MIC más alto para la penicilina en comparación con los neumococos sin fragmentos adquiridos. Además, se ha observado que neumococo puede desarrollar mutaciones compensatorias que permiten que las proteínas PBPs mantengan su papel fisiológico en el metabolismo de la pared celular, al tiempo que tienen una menor afinidad por la penicilina (79-80).

Asimismo, son limitaciones del estudio el no haber incluido también cepas sensibles por el disco de oxacilina, de esta manera tener un visión más amplia sobre el efecto de los genes estudiados. Además, solo se analizaron los genes *pbps* más frecuentes asociados a la resistencia.

VIII. Conclusiones

- Se estandarizó dos sistemas triplex de reacción en cadena de la polimerasa convencional que permitieron amplificar genes no alterados de cepas invasivas y colonizadoras.
- El 96.7% (58/60) invasivas así como el 93.4% (127/136) colonizadoras presentaron el gen *pbp2x* alterado. Por otra parte, las cepas con *murM* alterado fueron menos frecuentes en ambos grupos 5.0% (3/60) en cepas invasivas y 13.2%(18/136) en cepas de portadores.
- La alteración en *pbp2b* resultó ser significativamente más prevalente en cepas colonizadoras que invasivas; caso contrario, se observó respecto a *pbp1a*
- La presencia de un mayor número de genes alterados incrementa el valor del MIC tanto en cepas invasivas como en colonizadoras.
- La presencia de genes *pbps* alterados afectan la resistencia, los cuales se evidencian únicamente cuando se consideran puntos de corte meníngeos en cepas no-sensibles a penicilina según el disco de oxacilina.

IX. Recomendaciones

Con el fin de ampliar el conocimiento de los mecanismos de resistencia a penicilina sería recomendable emplear tecnologías como secuenciación del genoma completo que nos brindarían más información sobre los genes evaluados en este estudio y permitirían a su vez identificar otros genes asociados a las resistencia (82).

X. Referencias bibliográficas

1. Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines:

global, regional, and national estimates for 2000-15. Lancet Glob Health. 2018; 6(7):e744-e757.

2. Bush LM. Pneumococcal Infections [Internet]. MSD Manual Consumer Version. [Citado el 16 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/home/infections/bacterial-infections-gram-positive-bacteria/pneumococcal-infections>

3. McGee L, McDougal L, Zhou J, et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. J Clin Microbiol. 2001; 39(7):2565-2571.

4. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis [published correction appears in FEMS Microbiol Rev. 2008 May; 32(3):556]. FEMS Microbiol Rev. 2008; 32(2):234-258.

5. Filipe SR, Severina E, Tomasz A. Distribution of the mosaic structured murM genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol. 2000; 182 (23):6798-6805.

6. del Campo R, Cafini F, Morosini MI, et al. Combinations of PBPs and MurM protein variants in early and contemporary high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(5):983-986

7. Du Plessis M, Bingen E, Klugman KP. Analysis of penicillin-binding proteins genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:2349-57.

8. Smith AM, Klugman KP. Alterations in MurM, a cell wall mucopeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45, 2393-2396.

9. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al., editores. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: Springer; 2019.

10. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editores. The prokaryotes: Archaea and bacteria - Firmicutes, Actinomycetes v. 3: A handbook on the

biology of bacteria. 3a ed. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: Springer; 2006.

11. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana [Internet]. Paho.org. [citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

12. Van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009; 374(9700):1543-1556.

13. Jauneikaite E, Tocheva AS, Jefferies JM, et al. Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods*. 2015; 113:41-49.

14. Brown J, Hammerschmidt S, Orihuela C, editores. *Streptococcus pneumoniae: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions*. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Academic Press; 2015

15. Lloyd-Evans N, O'Dempsey TJ, Baldeh I, et al. Nasopharyngeal carriage of pneumococci in Gambian children and in their families. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15(10):866-871.

16. Simell B, Auranen K, Käyhty H, et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11(7):841-855.

17. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:83–93.

18. Mitchell C. OPS/OMS | Acerca del Neumococo. Pan American Health Organization / World Health Organization. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1894:2009-about-pneumococcus-disease&Itemid=1630&lang=es. Published 2020.

19. Ochoa TJ, Egoavil M, Castillo ME, Reyes I, Chaparro E, Silva W, et al. Invasive pneumococcal diseases among hospitalized children in Lima, Peru. *Rev. Pan. Salud Pública*. 2010; 28(2):121-7.

20. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*. 2017 Mar 29; 90(1):135-145.
21. Miller EL. The penicillins: a review and update. *J Midwifery Womens Health*. 2002; 47(6):426-434.
22. Maguiña Vargas C. *Uso Racional De Antibióticos*. 4th ed. Lima: Ciro Maguiña Vargas, Editor; 2018:24.
23. Gunnison JB, Fraher MA, Pelcher EA, Jasetz E. Penicillin-resistant variants of pneumococci. *Appl Microbiol*. 1968 Feb; 16(2):311-4.
24. McGee L, McDougal L, Zhou J, et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2565-2571.
25. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis*. 2013;17(6):672-681.
26. Ochoa Woodell TJ. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina en portadores nasofaríngeos menores de 2 años. *Rev Med Hered*. 1998; 9(2):56-62.
27. Cullota AR, Kalter HD, Delgado J, Gilman RH, Facklam RR, Velapatino B, et al. Antimicrobial susceptibilities and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolates from a low socioeconomic area in Lima, Peru. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(6):1328-31.
28. Ochoa TJ, Rupa R, Guerra H, Hernandez H, Chaparro E, Tamariz J, et al. Penicillin resistance and serotypes/serogroups of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children younger than 2 years in Lima, Peru. *Diagnostic Microbiol Infect Dis*. 2005;52(1):59-64.
29. Guevara J, Ocas J, Valencia E, Rojas J, Flores P. Prevalencia y resistencia de Neumococos en una población escolar aparentemente sana. *Rev Per Med Trop*. 2004;19(1):59-63.

30. Velásquez ER, Torres N, Horna G, Pando J, Castillo ME, Hernández R, et al. Sensibilidad antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en portadores nasofaríngeos en niños menores de un año en Lima, Perú. Acta Med Peruana. 2008; 25(3):148-52.
31. Torres N, Velásquez R, Mercado EH, Egoavil M, Horna G, Mejía L, et al. Resistencia antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en portadores nasofaríngeos sanos de siete regiones del Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2013; 30(4):575-82.
32. Morales S, Díaz S, González D, Huapaya B. Susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* determinando la concentración inhibitoria mínima, 1999. Rev Med Exp Salud Pública. 2001; 18(1-2):35-37.
33. Ochoa TJ et al. Invasive pneumococcal diseases among hospitalized children in Lima, Peru. Revista Panamericana de Salud Pública. 2010; 28:121–127.
34. Luna-Muschi A et al. Invasive pneumococcal disease in hospitalised children from Lima, Peru before and after introduction of the 7-valent conjugated vaccine. Epidemiology and Infection. 2019; 147, e91, 1–5.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth informational supplement M100-S24. Wayne, PA: CLSI; 2019.
36. Noda Albelo Amauri Lázaro, Vidal Tallet Lázaro Arturo, Vidal Casal Joan Iavier, Hernández Álvarez Leanet. Utilización de la penicilina en la infección extrameningea por *Streptococcus pneumoniae*. Rev Cubana Pediatr [Internet]. 2011 Dic [citado 2022 Mayo 06]; 83(4):405-412. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475312011000400008&lng=es.
37. Jetté LP, Sinave C. Use of an oxacillin disk screening test for detection of penicillin-and ceftriaxone-resistant pneumococci. J Clin Microbiol. 1999; 37(4):1178–81.
38. Horna G, Molero ML, Benites L, Roman S, Carbajal L, Mercado E, et al. Oxacillin disk diffusion testing for the prediction of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Rev Panam Salud Pública. 2016; 40(1):57–63.

39. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32(2):149-167.
40. Massidda O, Nováková L, Vollmer W. From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ Microbiol.* 2013;15(12):3133-3157
41. Philippe J, Vernet T, Zapun A. The elongation of ovococci. *Microb Drug Resist.* 2014; 20(3):215-221.
42. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis [published correction appears in *FEMS Microbiol Rev.* 2008 May; 32(3):556]. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):234-258.
43. Hoskins J, Matsushima P, Mullen DL, et al. Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 1999; 181(20):6552-6555.
44. Severin A, Schuster C, Hakenbeck R, Tomasz A. Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 1992; 174(15):5152-5155.
45. Berg KH, Stamsås GA, Straume D, Håvarstein LS. Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol.* 2013; 195(19):4342-4354
46. Land AD, Tsui HC, Kocaoglu O, et al. Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol.* 2013; 90(5):939-955.
47. Peters K, Schweizer I, Beilharz K, et al. *Streptococcus pneumoniae* PBP2x mid-cell localization requires the C-terminal PASTA domains and is essential for cell shape maintenance. *Mol Microbiol.* 2014;92(4):733-755.
48. Tsui HT, Boersma MJ, Vella SA, et al. Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol.* 2014;94(1):21-40.

49. Tsui HT, Boersma MJ, Vella SA, et al. Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol.* 2014; 94(1):21-40.
50. Rasmussen JR, Strominger JL. Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(6):2730-4.
51. Waxman D, Strominger J. Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics¹. *Annual Review of Biochemistry.* 1983; 52(1):825-869.
52. Hakenbeck R, Brückner R, Denapaite D, Maurer P. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2012;7(3):395-410
53. Sanbongi Y, Ida T, Ishikawa M, et al. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6):2244-50.
54. Ohsaki Y, Tachibana M, Nakanishi K, et al. Alterations in penicillin binding protein gene of *Streptococcus pneumoniae* and their correlation with susceptibility patterns. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(2):140-146.
55. Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, et al. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(22):8842-8846.
56. Laible G, Spratt BG, Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered *pbp 2x* genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1991; 5(8):1993-2002.
57. Martin C, Sibold C, Hakenbeck R. Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *EMBO J.* 1992; 11(11):3831-3836.
58. Smith AM, Klugman KP. Alterations in MurM, a cell wall mucopeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45, 2393–2396.

59. Filipe SR, Severina E, Tomasz A. Distribution of the mosaic structured *murM* genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2000;182(23):6798-6805.
60. del Campo R, Cafini F, Morosini MI, et al. Combinations of PBPs and MurM protein variants in early and contemporary high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(5):983-986.
61. Du Plessis M, Bingen E, Klugman KP. Analysis of penicillin-binding proteins genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 2349–57.
62. S P Galhano B, G Ferrari R, Panzenhagen P, S de Jesus AC, A Conte-Junior C. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms.* 2021; 9(5):923. Published 2021 Apr 26.
63. Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, et al. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48 (6):915-918.
64. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Sunakawa K. Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(5):1488-1494.
65. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, et al. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* [published correction appears in *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):638]. *N Engl J Med.* 2006; 354(14):1455-1463.
66. Hampton LM, Farley MM, Schaffner W, et al. Prevention of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* with conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 2012;205 (3):401-411.
67. Torres A, Bonanni P, Hryniewicz W, Moutschen M, Reinert RR, Welte T. Pneumococcal vaccination: what have we learnt so far and what can we expect in the

future? [published correction appears in Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Feb;34(2):415-6]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(1):19-31.

68. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System [Internet]. Who.int. [citado el 10 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WSI-AMR-2019.1>

69. Gunnison JB, Fraher MA, Pelcher EA, Jasetz E. Penicillin-resistant variants of pneumococci. Appl Microbiol. 1968; 16(2):311-314

70. Dowson CG, Johnson AP, Cercenado E, George RC. Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(1):49–53.

71. Hotomi M, Billal DS, Shimada J, et al. High prevalence of *Streptococcus pneumoniae* with mutations in *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* genes of penicillin-binding proteins in the nasopharynx in children in Japan. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2006;68(3):139-145.

72. Chiba N, Morozumi M, Ubukata K. Application of the real-time PCR method for genotypic identification of β -lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. Microb Drug Resist. 2012; 18(2):149-156.

73. Fani F, Brotherton MC, Leprohon P, Ouellette M. Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2013; 68(8):1718–27

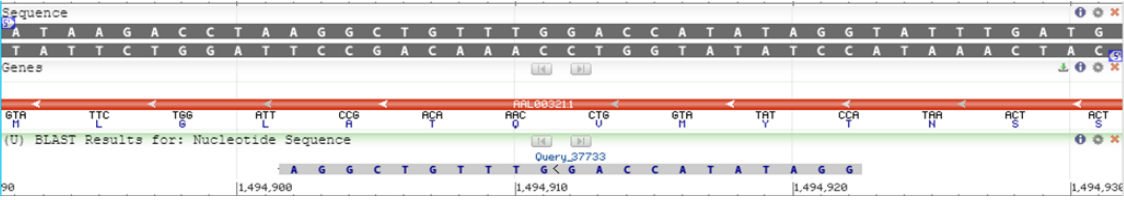
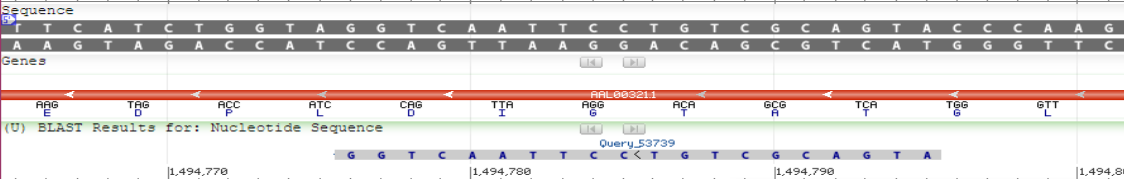
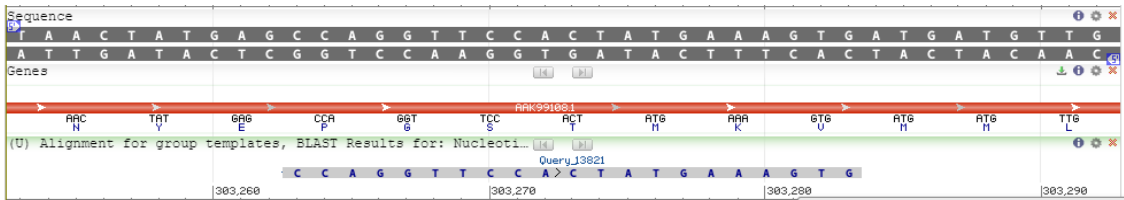
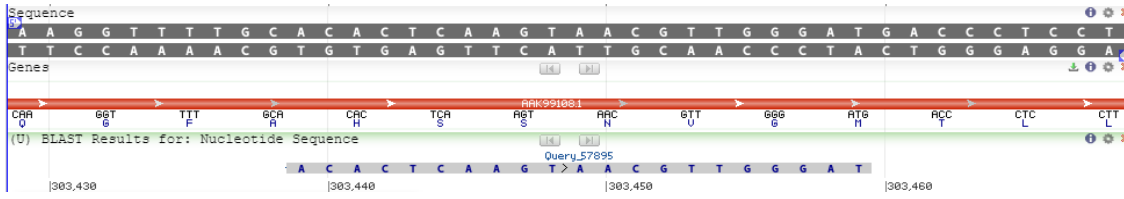
74. Smith AM, Klugman KP. Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level beta-lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(11):4622–7.

75. Muñoz R, Dowson CG, Daniels M, Coffey TJ, Martin C, Hakenbeck R, et al. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol. 1992; 6(17):2461–5.

76. Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(4):829-834.
77. Schweizer I, Blättner S, Maurer P, et al. New Aspects of the Interplay between Penicillin Binding Proteins, murM, and the Two-Component System CiaRH of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A Isolates from Hungary. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(7):e00414-17.
78. G. Velapatiño, B. Quintero, M. Araque, M. Egoavil, et al. Penicillin binding protein gene alteration among penicillin-susceptible strain isolates from invasive pneumococcal disease. Poster presentado en: 23rd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases; 2013 Abr 28; Berlin, Germany.
79. Laible G, Spratt BG, Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered *pbp2x* genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* . *Mol Microbiol.* 1991;5:1993–2002. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00821.x.
80. Dowson CG, Coffey TJ, Kell C, Whiley RA. Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1993; 9:635–643.

XI. Anexos

Anexo 1: Ubicación de los primers en la secuencia de los genes *pbps* y *murM* de la cepa *Streptococcus pneumoniae* R6.

Gen	Primer	Ubicación en cepa <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6
<i>pbp2b</i>	F: CCTATATGGTCCAAACAGCCT	
	R: GGTCAATTCCTGTCGCAGTA	
<i>pbp2x</i>	F: CCAGGTTCCACTATGAAAGTG	
	R: ATCCCAACGTTACTTGAGTGT	

Gen

Primer

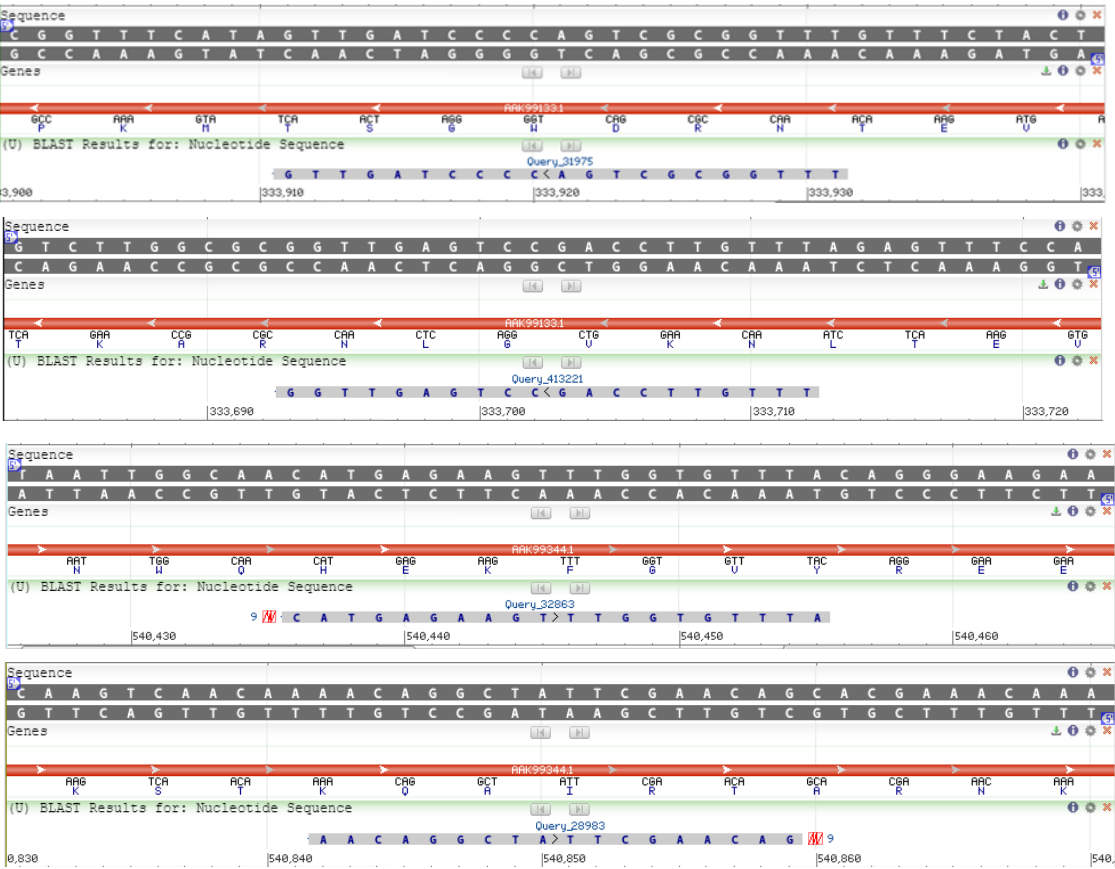
Ubicación en cepa *Streptococcus pneumoniae* R6

pbp1a F:AAACCGCGACTGGGGATCAAC

R:GGTTGAGTCCGACCTTGTTT

murM F:GCTGGATCCCATGAGAAGTTTGGTGTTTA

R:GCTGAATTCCTGTTCTGAATAGCCTGTT



Anexo 2. Master mix para la amplificación de genes *murM*, *lytA*, *pbp2x* (trioplex 1).

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. 1 RX (µl)
Agua			7.2
Buffer	5X	1X	4
MgCl	25mM	2mM	1.6
dNTP	10mM	0.4mM	0.5
<i>lytA</i> F-R	10mM	0.2mM	0.3
<i>pbp2x</i> F-R	10mM	0.5mM	1
<i>MurM</i> F-R	10mM	0.4mM	1
enzima	5 U/ µL	32.5mU/ µL	0.13
ADN			2
Total vol.			17.03

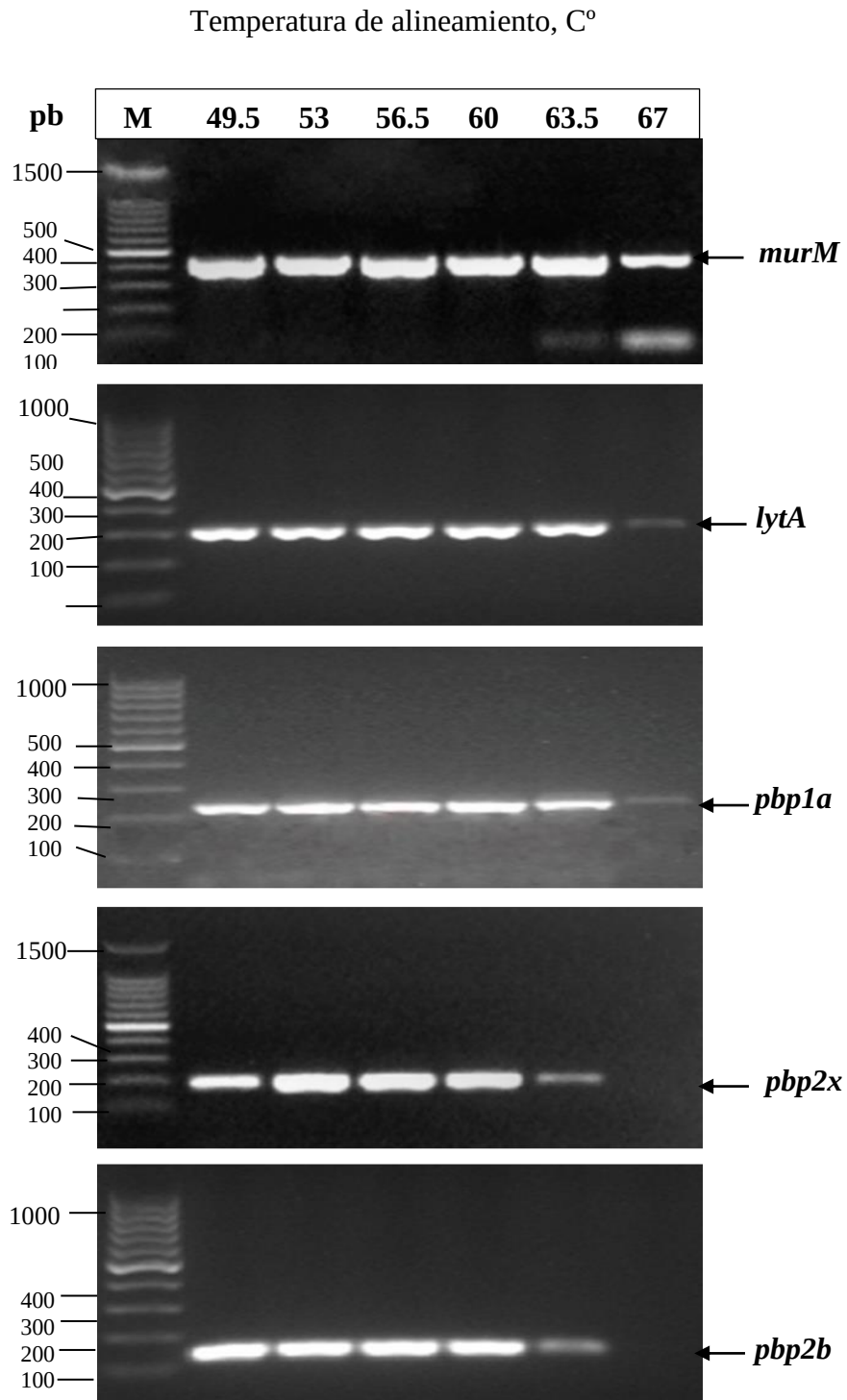
Anexo 3. Master mix para la amplificación de genes *pbp1a*, *pbp2b* y *lytA* (trioplex 2)

Componente	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol1 RX (µl)
agua PCR			5.8
buffer	5X	1X	4
MgCl	25mM	2Mm	1.6
dNTPs	10mM	0.4Mm	0.5
<i>lytA</i> F-R	10mM	0.5Mm	1
<i>pbp2b</i> F-R	10mM	0.5Mm	1
<i>pbp1a</i> F-R	10mM	0.5Mm	1
enzima	5 U/ul	32.5mU/Ul	0.13
ADN			2
Total vol.			17.03

Anexo 4. Ciclos de amplificación utilizados en el proceso de estandarización

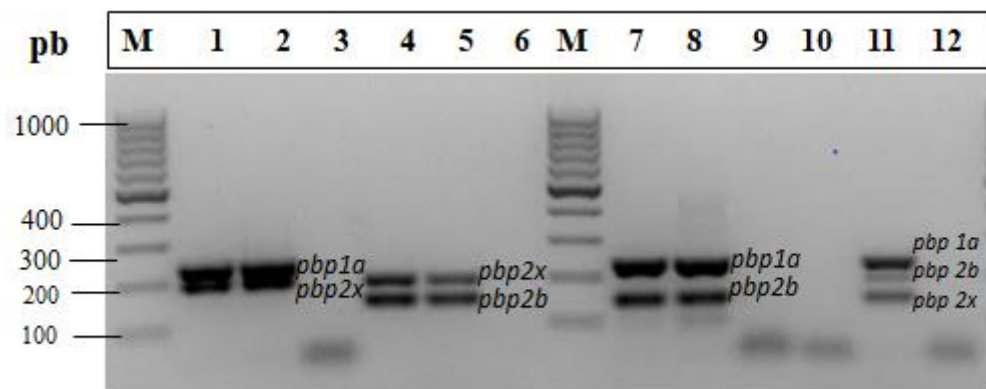
Etap	Temperatura	Tiempo
Desnaturación inicial	95 °C	2min
Desnaturación	95 °C	15s
Hibridación	50, 52.5, 55, 57.5, 60 y 62.5°C	20s
Extensión	72°C	30s
Extensión final	72°C	7 min

Anexo 5. Evaluación de sistemas de PCR convencional.



Curva de temperatura de PCR. Todas las reacciones fueron evaluadas en una sola corrida. La temperatura de alineamiento de 60 °C es la que proporciona la más alta especificidad y mejor visibilidad de bandas. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con TBE al 0.5X con 10uL de master mix. La corrida fue a 90 voltios por 50 min.

Anexo 6. Sistemas dúplex y triplex de los genes *pbps*.



Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con TBE al 0.5X. La corrida fue a 90 voltios por 50 min. Se corrió a 10uL de master mix. M: marcado de peso molecular, carriles 3,6,9,12: Controles negativos. No hubo amplificación en carril 10.